



AVERTISSEMENT

Ce document est le fruit d'un long travail approuvé par le jury de soutenance et mis à disposition de l'ensemble de la communauté universitaire élargie.

Il est soumis à la propriété intellectuelle de l'auteur. Ceci implique une obligation de citation et de référencement lors de l'utilisation de ce document.

D'autre part, toute contrefaçon, plagiat, reproduction illicite encourt une poursuite pénale.

Contact : ddoc-theses-contact@univ-lorraine.fr

LIENS

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 122. 4

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 335.2- L 335.10

http://www.cfcopies.com/V2/leg/leg_droi.php

<http://www.culture.gouv.fr/culture/infos-pratiques/droits/protection.htm>



UNIVERSITÉ
DE LORRAINE

ÉCOLE
DOCTORALE

RP2E



INRA
SCIENCE & IMPACT

Université de Lorraine

Unité Mixte de Recherche 1128 INRA/UL

Collegium Sciences et Technologies

Unité Mixte de Recherche 1136 INRA/UL

Ecole doctorale « Ressources Procédés Produits Environnement »

Thèse présentée pour l'obtention du titre de
Docteur de l'Université de Lorraine
En Écotoxicologie, Biodiversité, Écosystèmes

par **Justine GALET**

Vers la compréhension des dialogues microbiens dans l'écosystème sol:

étude de l'interaction entre *Streptomyces* et *Pseudomonas*

Towards the understanding of microbial dialogues within soil ecosystem:

study of the interaction between *Streptomyces* and *Pseudomonas*

Soutenance publique prévue le 16 Septembre 2014 devant la commission d'examen :

Membres du jury

Rapporteurs

Sébastien Rigali, Chercheur qualifié FRS-FNRS, Université de Liège

Alain Sarniguet, Directeur de Recherche, INRA de Rennes

Examineurs

Philippe Normand, Directeur de Recherche, CNRS, Université de Lyon 1

Isabelle Schalk, Directrice de Recherche, CNRS, Université de Strasbourg

Pierre Leblond, Professeur, Université de Lorraine, Directeur de thèse

Bertrand Aigle, Professeur, Université de Lorraine, Co-directeur de thèse

Pascale Frey-Klett, Directrice de Recherche, INRA, Co-directeur de thèse

SOMMAIRE

Introduction.....	2
1. Préface.....	2
2. L'écosystème forestier	4
2.1. Les fonctions de l'écosystème forestier	4
2.2. La stratification de l'écosystème forestier: des arbres au sous-sol forestier.....	5
2.3. Le sol forestier : un environnement riche et dynamique.....	5
2.4. Les interactions dans le sol forestier	7
2.4.1. Les interactions bactéries-bactéries, bactéries-champignons	7
2.4.2. Les interactions bactéries-plantes.....	8
2.4.3. Les interactions champignons-plantes et bactéries.....	8
2.4.4. Les interactions insectes-bactéries et plantes	10
2.5. Les métabolites secondaires dans le sol forestier.....	12
3. Effet de microorganismes sur la synthèse de métabolites secondaires produits par d'autres microorganismes	13
3.1. Effet des interactions par contact cellulaire sur le métabolisme secondaire	14
3.1.1. Induction de la production de métabolites secondaires.....	14
3.1.2. Induction de la synthèse de nouveaux métabolites secondaires	15
3.2. Effet des interactions chimiques sur le métabolisme secondaire.....	16
3.2.1. Effet de molécules sécrétées sur le métabolisme secondaire	16
3.2.1.1. Impact sur la synthèse de métabolites secondaires	16
3.2.1.2. Interactions chimiques et réponse écologique	17
3.2.1.3. Interactions chimiques et dialogue moléculaire	18
3.2.2. Effet de molécules issues de la paroi de microorganismes sur le métabolisme secondaire	20
3.2.2.1. Effet de polymères pariétaux sur le métabolisme secondaire.....	20
3.2.2.2. Effet d'oligomères pariétaux sur le métabolisme secondaire	21
3.2.2.3. Effet de monomères pariétaux sur le métabolisme secondaire	21
3.2.3. Quorum sensing et métabolisme secondaire.....	22
3.2.3.1. Quorum Sensing ou système d'auto-induction.....	22
3.2.3.2. Le quorum sensing chez les bactéries Gram négatives.....	23
3.2.3.3. Le quorum sensing chez les bactéries Gram positives	24
3.2.3.4. Régulation croisée entre molécules de QS.....	26
3.2.4. Quorum quenching et métabolisme secondaire.....	27

3.2.4.1.	Quorum Quenching ou comment contrer le QS	27
3.2.4.2.	Empêcher la production des molécules signal	27
3.2.4.3.	Dégrader les molécules signal	28
3.2.4.4.	Entrer en compétition avec les molécules signal	28
3.3.	Effet de l'environnement physico-chimique sur le métabolisme secondaire des microorganismes	29
4.	Effets des métabolites secondaires sur les communautés microbiennes de l'environnement	30
4.1.	Diversité des métabolites secondaires dans le sol	30
4.2.	Les métabolites secondaires, des molécules antagonistes	30
4.2.1.	Effet antagoniste des antibiotiques	30
4.2.2.	Effet antagoniste des bactériocines	31
4.2.3.	Effet antagoniste des sidérophores.....	31
4.2.4.	Effet antagoniste des AHL et de leurs produits de dégradation	32
4.2.5.	Effet antagoniste des molécules volatiles	33
4.3.	Les métabolites secondaires, des molécules bénéfiques.....	34
4.3.1.	Effet bénéfique des sidérophores	34
4.3.1.1.	Chélation du fer par les sidérophores	34
4.3.1.2.	Chélation des autres métaux par les sidérophores.....	35
4.3.2.	Effets bénéfiques des phytohormones	35
4.3.3.	Effets bénéfiques des composés volatiles.....	36
4.4.	Les métabolites secondaires, des molécules de signalisation.....	36
5.	<i>Streptomyces</i> et <i>Pseudomonas</i>	38
5.1.	Importance des <i>Streptomyces</i> et <i>Pseudomonas</i> dans le sol	39
5.2.	Cycle de développement et production de métabolites secondaires chez <i>Streptomyces</i>	40
5.3.	Modèles d'étude	41
5.3.1.	<i>S. ambofaciens</i> ATCC 23877	41
5.3.2.	<i>P. fluorescens</i> BBc6R8.....	42
6.	Objectifs de la thèse	43
	Résultats	46
1.	Stratégie de travail	46
1.1.	Approches.....	46
1.1.1.	Criblage d'interactions : réalisation de cocultures entre <i>S. ambofaciens</i> ATCC 23877 et d'autres bactéries du sol	46

1.1.2.	Criblage à moyen débit de microorganismes capables d'influencer le métabolisme secondaire de <i>S. ambofaciens</i>	47
1.2.	Mise en évidence de trois interactions entre <i>Streptomyces</i> et <i>P. fluorescens</i> BBc6R8	48
2.	Piratage de sidérophores entre <i>S. ambofaciens</i> ATCC 23877 et <i>Pseudomonas</i> BBc6R8	48
2.1.	Introduction.....	48
2.1.1.	Importance du fer pour les organismes vivants.....	48
2.1.2.	Les sidérophores chez <i>Pseudomonas fluorescens</i>	49
2.1.3.	Les sidérophores chez <i>S. ambofaciens</i> ATCC 23877 et <i>S. coelicolor</i> A3(2).....	50
2.1.4.	Compétition pour le fer : Piratage des sidérophores	51
2.2.	Résumé des résultats	52
2.2.1.	<i>S. ambofaciens</i> ATCC 23877 utilise les sidérophores de <i>P. fluorescens</i> BBc6R8 et empêche la production de pyoverdine	52
2.2.2.	Impact de <i>S. ambofaciens</i> ATCC 23877 sur l'expression des gènes impliqués dans la synthèse des sidérophores de <i>P. fluorescens</i> BBc6R8.....	53
2.2.3.	<i>P. fluorescens</i> BBc6R8 capte les sidérophores de <i>S. ambofaciens</i> via un récepteur TonB-dépendant.....	55
2.2.4.	L'utilisation des desferrioxamines de <i>S. ambofaciens</i> ATCC 23877 est un phénomène répandu parmi d'autres <i>P. fluorescens</i> et <i>P. aeruginosa</i>	57
2.3.	Discussion	57
3.	Dialogue moléculaire entre <i>S. ambofaciens</i> ATCC 23877 et <i>P. fluorescens</i> BBc6R8	60
3.1.	Quorum sensing et synthèse de l'antibiotique kinamycine chez <i>S. ambofaciens</i> ATCC23877	60
3.1.1.	<i>S. ambofaciens</i> ATCC23877 et le cluster <i>alp</i>	60
3.1.2.	Modèle de régulation du cluster <i>alp</i>	61
3.2.	Résultats	64
3.2.1.	Effet inhibiteur de <i>P. fluorescens</i> sur la synthèse de kinamycine chez <i>S. ambofaciens</i> 64	
3.2.2.	Effet de <i>P. fluorescens</i> BBc6R8 sur l'expression du gène <i>alpV</i>	65
3.2.3.	Effet de <i>P. fluorescens</i> BBc6R8 sur la voie de régulation contrôlant la synthèse de kinamycine.....	67
3.2.4.	Effet de <i>P. fluorescens</i> BBc6R8 sur la molécule de QS régulant la synthèse de kinamycine chez <i>S. ambofaciens</i> ATCC 23877.....	70
3.2.5.	Implication d'un dialogue moléculaire, « effet-ping-pong » ?	71
3.2.6.	Quels sont les acteurs moléculaires impliqués dans l'interaction ?	72
3.2.7.	Étude de la spécificité de l'interaction	80
3.3.	Discussion	82

4.	Inhibition de la synthèse de γ -actinorhodine chez <i>S. coelicolor</i> A3(2) par <i>P. fluorescens</i> BBc6R8	84
4.1.	Introduction.....	84
4.1.1.	<i>S. coelicolor</i> A3(2).....	84
4.1.2.	Synthèse d'actinorhodine et de γ -actinorhodine chez <i>S. coelicolor</i> A3(2).....	85
4.2.	Résumé des résultats	86
4.2.1.	<i>P. fluorescens</i> BBc6R8 inhibe la production de γ -actinorhodine chez <i>S. coelicolor</i> M145	86
4.2.2.	L'acidification du milieu par <i>P. fluorescens</i> BBc6R8 par la production d'acide gluconique inhibe la synthèse de γ -actinorhodine chez <i>S. coelicolor</i>	87
4.2.3.	L'inhibition de la γ -actinorhodine chez <i>S. coelicolor</i> est un phénomène répandu parmi d'autres <i>Pseudomonas fluorescens</i> et <i>P. aeruginosa</i>	88
4.3.	Discussion	89

Discussion générale, perspectives Conclusions..... 92

1.	Influence de la bactérie du sol <i>P. fluorescens</i> BBc6R8 sur la production de métabolites secondaires chez <i>Streptomyces</i>	93
1.1.	Rôle du quorum quenching sur la synthèse de kinamycine chez <i>S. ambofaciens</i> ATCC 23877	93
1.2.	Rôle de l'acide gluconique sur la synthèse de γ -actinorhodine chez <i>S. coelicolor</i> M145..	95
1.3.	Impact de ces interactions dans l'écosystème sol	97
1.3.1.	Le métabolite secondaire est une molécule à activité antagoniste.....	97
1.3.2.	Le métabolite secondaire est une molécule de signalisation	99
1.3.3.	Dégradation des molécules signal régulant le QS	100
1.4.	Les perspectives	102
2.	Piratage de sidérophores entre <i>S. ambofaciens</i> ATCC 23877 et <i>P. fluorescens</i> BBc6R8.....	102
2.1.	Avantage écologique à utiliser les sidérophores desferrioxamines, des sidérophores répandus.....	102
2.2.	FoxA, un récepteur de sidérophores tris-hydroxamate	104
2.3.	Le gène <i>foxA</i> , un gène répandu.....	104
2.4.	Le piratage des sidérophores, un mécanisme répandu	109
2.5.	Perspectives.....	110
3.	Conclusions.....	110

Annexes 113

1.	Matériels et Méthodes de l'interaction entre <i>S. ambofaciens</i> ATCC 23877 et <i>S. coelicolor</i> A3(2) sur milieu R2.....	113
----	--	-----

1.1.	Souches bactériennes, conditions de culture et vecteurs utilisés	113
1.2.	Manipulation de l'ADN et analyse transcriptionnelle	116
1.2.1.	Manipulation de l'ADN	116
1.2.2.	Analyse transcriptionnelle.....	119
1.3.	Tests de bioactivité.....	120
1.4.	Extraction de l'antibiotique	121
1.4.1.	Extraction de l'antibiotique intracellulaire.....	121
1.4.2.	Extraction de l'antibiotique à partir du milieu de culture	121
1.5.	Construction d'un système rapporteur chez <i>S. ambofaciens</i> ATCC23877	121
1.5.1.	Obtention du vecteur pIJ8660-pro- <i>alpV</i>	121
1.5.2.	Conjugaison chez <i>S. ambofaciens</i> ATCC 23877	122
1.6.	Analyses bioinformatiques	122
Références		124

-Chapitre 1-

Introduction

Introduction

1. Préface

La très grande majorité des espèces vivantes non décrites sont des procaryotes et des eucaryotes unicellulaires (algues, certains champignons...), c'est-à-dire des microorganismes (Mora et al. 2011). Il aura fallu des inventions majeures de scientifiques de renom tels que Robert Hooke ou Antonie van Leeuwenhoek et attendre plusieurs siècles d'investigation pour que les microorganismes soient détectés puis reconnus comme indispensables au maintien de l'équilibre écologique de notre planète (Tortora et al. 2012). Ils sont présents partout, que ce soit dans l'eau, sur terre, dans l'air et dans notre organisme. Ainsi, même dans les environnements que l'on croyait hostiles au maintien de la vie, nous avons découvert contre toute attente, que des organismes invisibles à l'œil nu s'y étaient parfaitement adaptés pour y proliférer.

Un constat s'impose, la vie est présente là où se trouve l'eau à l'état liquide et justement des microbes ont été retrouvés dans des environnements des plus insolites. Des calottes polaires jusqu'aux sources hydrothermales sous-marines, dans l'eau des déserts, les lacs hypersalins, les eaux acides ou encore à l'intérieur de la croûte terrestre (Madigan et al. 2012). Oui, les microorganismes sont partout, et de surcroît en grand nombre. Un gramme de sol peut contenir jusqu'à plusieurs milliards de bactéries. Des concentrations plus faibles (100/g) se retrouvent encore jusqu'à des centaines de mètres sous terre. Un millilitre d'eau douce ou d'eau de mer contient environ 10^5 - 10^6 bactéries. Nous avons 10 fois plus de cellules bactériennes dans notre corps que de cellules humaines ! Aux bactéries s'ajoutent les nombreux champignons, les micro-algues, les virus, etc. Les microorganismes forment ainsi un réservoir énorme de biodiversité dans le sol forestier.

Cependant, l'image des microbes dans l'imaginaire collectif est le plus souvent liée aux maladies infectieuses. Pourtant leur rôle est primordial dans l'équilibre de notre planète. En effet, les algues unicellulaires produisent de l'oxygène et fixent du carbone depuis 3,8 milliards d'années et ont contribué au développement de la vie sur Terre. Les bactéries et champignons fertilisent les sols en produisant de l'humus à partir des végétaux et des animaux morts, et sont indispensables à la vie et à la croissance des végétaux. Les microorganismes sont les premiers maillons de la chaîne alimentaire des écosystèmes aquatiques et interviennent dans le recyclage des éléments chimiques au niveau des sols, de l'eau, de l'air ou encore de la matière vivante (Tortora et al. 2012). Dans le corps humain, les bactéries contribuent à notre bonne santé en transformant ce que nous ne pouvons pas digérer. Elles synthétisent, par exemple, la vitamine K, indispensable pour une bonne coagulation du sang. Elles nous protègent aussi de l'agression d'autres organismes tels que des bactéries conférant des maladies.

Contrairement aux idées héritées du passé, ces organismes n'ont pas un mode de vie solitaire. Depuis les années 1960, l'existence d'une communication intercellulaire entre les bactéries d'une même espèce a été mise en évidence (McVittie et al. 1962; Khokhlov et al. 1966). En effet, les cellules peuvent communiquer et coordonner leurs activités de manière collective afin de répondre aux changements environnementaux de manière adaptée (Bodman et al. 2008). D'autre part, elles peuvent également interagir entre elles lors de compétition pour des ressources nutritives par exemple. Certaines bactéries ont développé des comportements « sociaux » tels que le cannibalisme ou le fratricide. Ces bactéries utilisent des mécanismes qui leur permettent de tuer des cellules bactériennes de la même espèce ou d'une espèce différente dans la population afin de les utiliser en tant que source de nourriture (Ellermeier et al. 2006; Claverys and Håvarstein 2007). Ainsi l'adaptation à son environnement passe selon les cas par des interactions de coopération ou de compétition. Il a également été démontré que les microorganismes peuvent être en interaction étroite avec des membres d'autres espèces (Yamanaka 2005a), d'autres genres (Filion et al. 1999; Luti and Mavituna 2010; Onaka et al. 2010; Pérez et al. 2011) ou même d'autres règnes (Hungate 1966; Kaltenpoth et al. 2005; Eckburg et al. 2005; Zientz et al. 2005; Kaiser et al. 2010; Nützmann et al. 2011). Ainsi, des interactions bactéries-champignons-plantes ou bactéries-insectes-plantes ont été mises en évidence. Un exemple célèbre est celui de la Truffe noire du Périgord. En effet, le développement de ce champignon est lié à son interaction avec des racines de plantes et avec des communautés bactériennes spécifiques (Antony-Babu et al. 2013).

Dans le cadre de ma thèse, je me suis plus particulièrement intéressée aux interactions bactériennes au sein de l'écosystème forestier. Les forêts, communément appelées les poumons de la Terre, représentent 30% des terres émergées. Elles sont habitées par de nombreux acteurs, chacun d'entre eux jouant un rôle indispensable au bon fonctionnement de l'écosystème: végétaux, producteurs de nourriture; animaux, consommateurs de végétaux; prédateurs, acteurs de l'équilibre de l'écosystème et décomposeurs qui transforment la matière morte en éléments minéraux simples, de nouveau assimilables par les plantes. Dans le sol forestier, cette intense activité et riche biodiversité sont retrouvées également à une échelle microscopique. En effet, de nombreux microorganismes sont présents. Ils assurent la disponibilité en azote minéral, l'altération des minéraux primaires dont dépend la fertilité des sols, le recyclage du carbone, le fonctionnement des cycles biogéochimiques et plus particulièrement la minéralisation de la matière (Dommergues and Mangenot 1970). Ces organismes, bactéries, champignons, interagissent entre eux mais également avec les plantes ou les insectes, avec lesquels il peuvent réaliser des interactions de coopération ou de compétition.

La complexité de ces interactions structure l'écosystème, fonde l'état d'équilibre qui régit le vivant, or les perturbations anthropiques et climatiques déstabilisent ces combinaisons. C'est pourquoi il est devenu indispensable de décrypter et d'appréhender ces interactions. Il y a environ 500 ans, Leonard de Vinci a dit « Nous connaissons mieux la mécanique des corps

célestes que le fonctionnement du sol sous nos pieds». Encore aujourd'hui, mieux connaître le fonctionnement biologique du sol est un axe de recherche central et nécessaire. Ceci permettra à terme d'améliorer nos connaissances des conditions de stabilité des communautés microbiennes complexes, d'anticiper des problèmes de dysfonctionnement et la résilience de l'écosystème forestier, c'est-à-dire sa capacité à se reconstituer suite à une perturbation telle que le changement climatique par exemple.

Dans le cadre de cette thèse, mon travail a permis d'initier l'étude de ces interactions et notamment l'étude de quelques-unes des formes de communication concourant à la structuration des communautés microbiennes du sol dans un système simple à deux partenaires. L'objectif à plus long terme étant d'analyser ces interactions à l'échelle des communautés et même du sol.

Je me suis plus particulièrement intéressée à la nature des dialogues entre les microorganismes constituant la communauté rhizosphérique du sol ainsi qu'à l'impact de ces interactions sur la modulation du métabolisme secondaire des microorganismes. L'introduction qui suit présentera donc un état de l'art axé sur ce sujet.

2. L'écosystème forestier

2.1. Les fonctions de l'écosystème forestier

Les forêts sont indispensables à l'équilibre de la planète. De plus, elles contribuent à la croissance économique au niveau national et mondial. Elles couvrent environ un tiers des terres émergées, ce qui représente entre 4 et 6 milliards d'hectares. Près de 25% des revenus des communautés dépendant des forêts proviennent des biens et des services fournis par ces dernières. La production des forêts gérées localement apporte chaque année 130 milliards de dollars aux populations pauvres (d'après les données de l'UICN (Union Internationale pour la Conservation de la Nature)).

La définition de la forêt varie selon les climats, les continents, la surface, la densité ou encore la hauteur des arbres. Cependant on peut tout de même la définir comme étant un ensemble végétal qui regroupe de multiples individus (arbres, arbustes, plantes) qui associés à d'autres espèces végétales et animales forment un écosystème spécifique. La forêt est un écosystème complexe et riche, offrant divers habitats à de nombreuses espèces et populations animales, végétales, fongiques et microbiennes entretenant entre elles des relations d'interdépendance. Cet écosystème est caractérisé par le milieu dans lequel il se trouve, le biotope, et par la communauté d'êtres vivants qui y habitent, la biocénose (Faurie 2002). L'écosystème forestier assure de nombreuses fonctions vitales. En effet, il contribue à la stabilité du climat. Il participe à la lutte contre l'effet de serre, grâce à la photosynthèse des végétaux qui absorbent le dioxyde carbone et rejettent de l'oxygène. Les forêts représentent un des plus importants puits de carbone terrestre. Elles structurent le paysage,

participent à la gestion de l'eau et notamment sa filtration ainsi qu'à la protection des sols contre l'érosion. Elles empêchent que la couche supérieure du sol, la couche la plus fertile, ne soit entraînée par les eaux de ruissellement. Elles fixent le sol par leurs racines et freinent le ruissellement des précipitations. Elles diminuent la vitesse du vent et les émissions sonores. Les forêts jouent le rôle de filtre à air, lors de fortes chaleurs, les poussières industrielles se déposent sur les feuillages et sont ensuite intégrées au sol lorsqu'il pleut. Cet écosystème représente un habitat pour la faune et la flore. En effet, les forêts sont un réservoir de la biodiversité terrestre puisque qu'elles abriteraient entre la moitié et les trois quarts de toutes les espèces vivantes.

2.2. La stratification de l'écosystème forestier: des arbres au sous-sol forestier

Ce sont les arbres qui structurent l'écosystème forestier. Sous le couvert arboré s'établit un microclimat puisque, la lumière est tamisée, la force du vent est atténuée, la température et l'humidité sont plus importantes. De plus, les arbres constituent des abris pour les différents animaux présents et ils contribuent également à alimenter les réseaux trophiques par la chute au sol d'éléments aériens (feuilles mortes, bois mort, fruits...) et par la présence d'exsudats racinaires.

Le peuplement végétal de la forêt se caractérise par différentes strates verticales (Parker and Brown 2000). Si l'on part de la plus élevée, il y a la strate arborescente (30 m) jusqu'à la strate hypogée, composée de la flore souterraine et de la microfaune du sol. Cette dernière comprend le mycélium des champignons, les bactéries, les décomposeurs, les organes souterrains des végétaux (racines, bulbes...), la litière (feuilles mortes et débris végétaux) et des animaux divers (l'endofaune). Une stratification semblable s'observe dans les différentes couches souterraines du sol. Le sol forestier n'est donc pas un environnement neutre, stérile où rien ne vit. Bien au contraire, il est formé de réseaux complexes notamment entre les insectes, les racines des végétaux, les champignons et les bactéries.

2.3. Le sol forestier : un environnement riche et dynamique

Un sol se caractérise par une succession de strates que l'on appelle aussi horizons, qui vont de la litière en surface, à la roche-mère en sous-sol, en passant par l'humus, le sol minéral et la couche d'altération (Henry 2013). De compositions et de structures différentes, ces horizons constituent son profil. Chaque élément finit au sol pour former la litière : branches et feuilles mortes, cadavres d'animaux, déchets d'êtres vivants... Ces éléments vont être convertis en matière organique grâce à l'action des organismes décomposeurs qui les fragmentent, tandis que d'autres digèrent les molécules organiques pour les transformer en éléments simples. Ceci permet la formation de la couche d'humus, réserve de matière organique dans le sol. La décomposition de l'humus libère de l'azote et d'autres éléments

nutritifs indispensables à la croissance des végétaux. En profondeur, la roche-mère qui s'altère forme un matériau meuble où les racines peuvent y puiser des éléments minéraux. Des échanges s'effectuent entre les différents horizons. La matière organique se mélange à des éléments minéraux sous l'effet conjugué de l'infiltration des eaux de pluie et de l'activité des vers de terre. Le sol, l'humus plus particulièrement, renferme une biodiversité essentielle au bon fonctionnement de la forêt, et même au bon fonctionnement de la vie sur Terre.

De par sa nature chimique et physique très hétérogène, le sol offre aux organismes qui y habitent des habitats très divers. Ainsi, des plantes à la microflore, des animaux à la microfaune, il est le réservoir d'une vie extrêmement abondante (Figure 1). Hormis les plantes qui y développent leurs racines et les animaux qui le modifient avec leurs terriers, deux autres catégories d'organismes ont été répertoriées : les invertébrés et la microflore. Les invertébrés sont surtout représentés par des insectes et des arachnides. Quant à la microflore, sa diversité n'est pas facile à estimer, il y a des bactéries, des champignons, des micro-algues ou encore des virus. Moins de 1% des bactéries et des virus auraient été jusqu'à présent décrits et seulement 4% des champignons (macroscopiques et microscopiques) auraient été identifiés. L'ensemble de ces microorganismes (microflore et microfaune) sont de loin les plus nombreux, bien que les plus petits. Comme chaque sol a ses propres caractéristiques physicochimiques, chaque sol contient donc une biodiversité qui lui est propre, que ce soit en termes de densité ou de diversité d'individus. L'ensemble des ces organismes établissent entre eux des interactions nécessaires au bon fonctionnement du sol et donc à la vie des forêts.

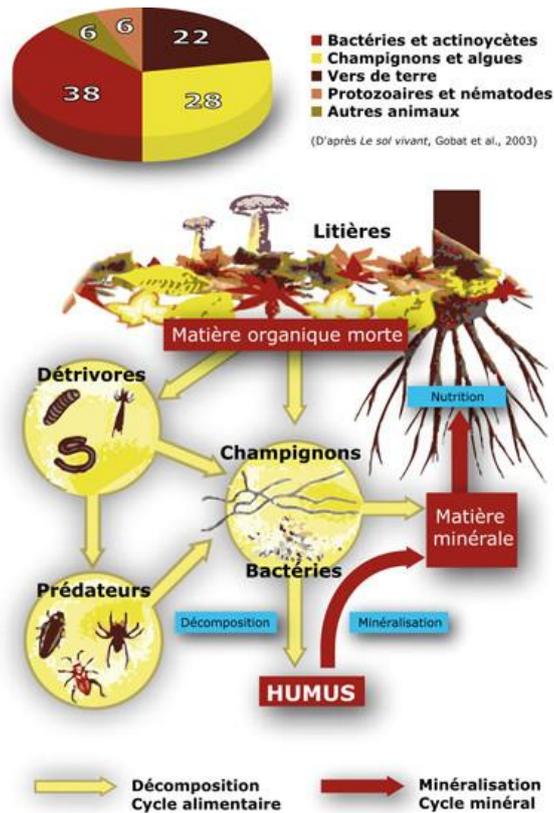


Figure 1 : Schéma représentant la diversité biologique et le fonctionnement du sol (Gobat et al. 2010)

2.4. Les interactions dans le sol forestier

À quelque échelle que l'on considère l'écosystème, les populations ne sont pas simplement juxtaposées mais chacune met en place des interactions avec les autres populations. Ces nombreuses interactions sont d'autant plus complexes que la communauté est diversifiée.

2.4.1. Les interactions bactéries-bactéries, bactéries-champignons

Les différentes espèces bactériennes ou fongiques peuvent être en interaction entre elles afin, par exemple, de subvenir à leurs besoins nutritionnels. Ainsi, *Proteus vulgaris* a besoin de biotine mais synthétise de l'acide nicotinique, *Bacillus polymyxa* a besoin d'acide nicotinique, mais synthétise de la biotine (Yeoh et al. 1968). En présence l'une de l'autre, ces deux bactéries peuvent se multiplier puisque chacune fournit à l'autre la vitamine dont elle a besoin. Dans le cas de symbioses, l'un des exemples où des bactéries, plus particulièrement des cyanobactéries, sont en association avec des champignons est celui des Lichens. Le champignon fournit le support et la protection, les sels minéraux, la réserve d'humidité à son

partenaire, la bactérie quant à elle fournit les nutriments issus de la photosynthèse chlorophyllienne.

2.4.2. Les interactions bactéries-plantes

Les microorganismes peuvent être en interaction avec les plantes et plus particulièrement avec leurs racines. L'effet de ces interactions sur la croissance des plantes peut être positif, négatif ou neutre. L'ensemble des bactéries colonisant les racines des plantes et influençant positivement leur croissance sont appelées des bactéries PGPR pour « Plant Growth-Promoting Rhizobacteria » (Kloepper et al. 1986; Frankenberger and Muhammad Arshad 1995). Ces bactéries, via la production d'hormones végétales telles que l'auxine, stimulent la croissance racinaire et via la synthèse de substances antibiotiques ou antifongiques protègent la plante d'agents pathogènes. Les bactéries du genre *Pseudomonas*, *Azospirillum*, *Azotobacter*, *Bacillus*, *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Xanthomonas* et *Serratia* en font partie.

Un autre type d'interaction existe entre les bactéries et les plantes, il s'agit de symbioses mutualistes. Un exemple connu est celui des *Rhizobiums*. Ce sont des bactéries qui rentrent en association avec des plantes de la famille des Fabacées (Spaink 2000). Cette symbiose se caractérise par la présence de nodosités au niveau racinaire ou caulinaire des plantes. Ces nodosités sont des organes d'échange métabolique entre les bactéries et les plantes. Elles vont permettre aux bactéries de bénéficier d'un habitat protecteur et d'un apport en substrats carbonés. En échange, les bactéries vont fixer et réduire l'azote atmosphérique en ammonium, directement assimilable par les plantes hôtes. On retrouve également ce type d'interaction entre *Frankia*, une actinobactérie, et les aulnes (Pujic and Normand 2009). En parallèle, des bactéries pathogènes de végétaux peuvent également former des nodosités avec leur plante hôte. C'est le cas d'*Agrobacterium tumefaciens*. Cette bactérie est responsable de la maladie de la galle du collet. Un fragment d'ADN de la bactérie, fragment du plasmide Ti (Tumor inducing), est transféré de la bactérie à la plante au niveau d'une blessure. Cet ADN s'insère dans le génome des cellules de plante où il induit la multiplication anarchique des cellules jusqu'à formation de la galle notamment via la production d'hormones végétales.

2.4.3. Les interactions champignons-plantes et bactéries

Certains champignons sont également capables de former des symbioses mutualistes avec des plantes, plus particulièrement avec leurs racines. On parle d'endomycorhize ou d'ectomycorhize selon la localisation interne ou externe du champignon aux cellules racinaires. Cette symbiose se traduit par un échange entre les deux partenaires. La plante en réalisant la photosynthèse fournit au champignon les sucres qu'il est incapable de produire par lui-même. Le champignon, quant à lui, fournit à la plante de l'eau et des éléments nutritifs tels que le phosphore ou l'azote. Ces nutriments sont peu accessibles aux racines car ils sont piégés dans les premiers centimètres du sol ou dans les minéraux. Les

champignons sécrètent dans leur environnement proche des enzymes et des acides qui libèrent ces éléments. Ils sont alors absorbés par le mycélium fongique, puis transférés à la plante au niveau de la mycorhize. Les champignons mycorhiziens jouent donc un rôle majeur dans la nutrition des arbres.

En milieu naturel, les mycorhizes sont entourées de communautés bactériennes complexes qui interagissent avec la plante et le champignon. Certaines souches bactériennes de la mycorhizosphère, région du sol directement influencée par les racines mycorhizées et les microorganismes associés, ont un effet délétère sur la formation des mycorhizes tandis que d'autres la favorisent. Ces dernières ont été baptisées « bactéries auxiliaires de la mycorhization » (Garbaye 1994; Frey-Klett et al. 2007; Deveau et al. 2008) (Figure 2). Ces bactéries auxiliaires de la mycorhization sont répandues dans les sols. Elles appartiennent à différents groupes taxonomiques tels que les protéobactéries (*Burkholderia*, *Rhizobium*), les firmicutes (*Bacillus*) et les actinomycètes (*Rhodococcus*, *Streptomyces*). Ces bactéries sont capables de stimuler la germination des spores de champignons ectomycorhiziens (Ali and Jackson 1989), d'améliorer la survie et la croissance du mycélium présymbiotique dans le sol (Brulé et al. 2001) ou d'augmenter les ramifications et le nombre de racines secondaires réceptives à la symbiose (Poole et al. 2001). Certaines bactéries auxiliaires pourraient déclencher la synthèse de métabolites chez les végétaux, tels que les flavonoïdes, molécule attractive qui attire le mycélium vers les racines, afin de favoriser la colonisation des racines par les champignons mycorhiziens (Xie et al. 1995). On peut citer comme exemple, la bactérie *Streptomyces* sp. AcH 505 qui agit à la fois comme auxiliaire de la symbiose entre l'Epicéa et le champignon ectomycorhizien *Amanita muscaria* et en parallèle comme antagoniste de la croissance du champignon phytopathogène *Heterobasidion cylindrosporium* (Riedlinger et al. 2006; Tarkka et al. 2008).

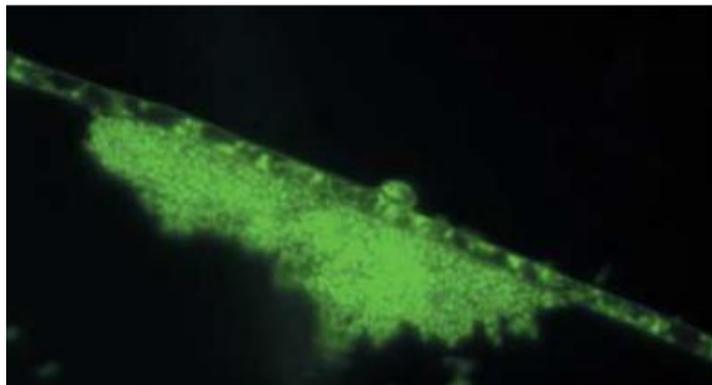


Figure 2 : Photographie au microscope à épifluorescence de la bactérie auxiliaire de mycorhization *Pseudomonas fluorescens* BBc6R8 marquée constitutivement avec la protéine fluorescente verte GFP sur un hyphes fongiques autofluorescents du champignon ectomycorhizien *Laccaria bicolor* S238N (Frey-Klett et al. 2007)

Ces symbioses mycorhiziennes influencent les communautés bactériennes en présence dans le sol environnant. En effet, la symbiose entre le pin Douglas et le champignon symbiotique ectomycorhizien *Laccaria bicolor* est responsable de la structure génotypique et fonctionnelle des communautés environnantes de *Pseudomonas* fluorescents (Uroz et al. 2007). Ceci résulterait de l'impact biochimique de la symbiose sur le sol environnant, ce que l'on appelle l'effet mycorhizosphère (Barea et al. 2002; Johansson et al. 2004; Boer et al. 2005). La mycorhizosphère sélectionne les souches capables par exemple de solubiliser le phosphate inorganique (via une acidification du pH) et efficaces pour mobiliser le fer (via la synthèse de sidérophores, des agents chélateurs de métaux). La symbiose a donc un effet indirect sur la nutrition des plantes de par sa pression de sélection sur les communautés bactériennes en présence (Frey et al. 1997; Frey-Klett et al. 2005).

D'autres types d'interactions peuvent également s'établir entre des champignons, des plantes et cette fois des bactéries intracellulaires aux champignons. Ces bactéries peuvent être mutualistes, pathogènes, ou commensales. Dans ce dernier cas, elles profitent de leur hôte mais ne lui apportent rien en retour. *Rhizopus microsporus* est un champignon pathogène qui produit la toxine rhizoxine, responsable de la destruction des racines des jeunes semis de riz. La rhizoxine n'est pas produite par le champignon lui-même mais par une bactérie endosymbiotique du genre *Burkholderia* (Partida-Martinez and Hertweck 2005). Cette bactérie est donc responsable du pouvoir phytopathogène du champignon, mais en plus, il a été montré que le champignon ne se reproduit pas en son absence, on peut alors parler de co-évolution (Partida-Martinez et al. 2007).

2.4.4. Les interactions insectes-bactéries et plantes

Une grande partie des insectes, classe qui regroupe à elle seule 70% des espèces animales, ont intégré des endosymbiotes bactériens dans leur système digestif (Heddi 2009). Les bactéries fournissent à leur hôte plusieurs composés métaboliques, comme les acides aminés et les vitamines. En retour, l'hôte garantit aux bactéries un habitat protecteur, la transmission et une source permanente de sucres, qui leur servent à fabriquer les produits essentiels à leur survie. En plus d'avoir un rôle dans la digestion, certaines bactéries apportent aux insectes un rôle de protection face à des agresseurs. Ainsi, certaines bactéries du genre *Streptomyces* ont été recrutées comme symbiotes chez les fourmis champignonnistes (Figure 3). Grâce à leur capacité à produire des molécules antifongiques, les *Streptomyces* protègent les champignons cultivés par les fourmis contre des attaques de champignons parasites (Zientz et al. 2005). De plus, la synthèse par les bactéries de vitamines, enzymes et/ou acides aminés favoriserait la croissance des fourmis. De la même manière, les guêpes apivores élèvent des bactéries dans leurs antennes et s'en servent pour protéger leurs jeunes des attaques de champignons (Kaltenpoth et al. 2005).

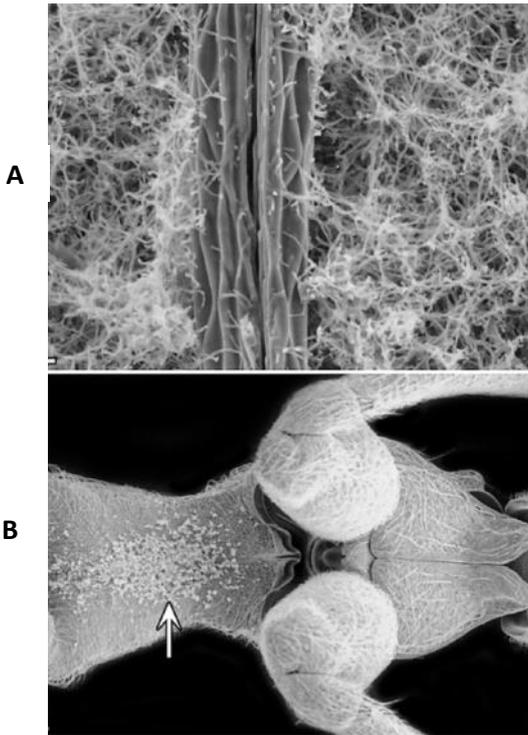


Figure 3 : Observation en microscopie électronique (A) des filaments mycéliens des bactéries *Streptomyces* présentes sur la cuticule d'une fourmi, (B) de la localisation des *Streptomyces* (flèche) sous la fourmi *Apterostigma* sp (d'après Currie et al. 1999)

Des travaux récents ont montré que des *Streptomyces* vivent en symbiose avec la guêpe *Sirex noctilio*. Cet insecte invasif détruit le bois. Alors que ce dernier ne produit pas d'activité cellulolytique, ce sont les bactéries via la synthèse d'enzymes qui lui permettent de dégrader le pin pour faciliter l'acquisition de nutriments pour les larves (Takasuka et al. 2013).

Les interactions peuvent même prendre un niveau supérieur avec des interactions tripartites, insecte-bactérie-plante (Kaiser et al. 2010). En effet, des chercheurs ont observé sur des feuilles jaunies de pommiers, la présence de halots verts autour de la larve du lépidoptère *Phyllonorycter blancardella*. Ce dernier est colonisé par des bactéries endosymbiotes du genre *Wolbachia* (Figure 4). Ces bactéries, via la synthèse d'une hormone végétale, la cytokinine, favoriserait la production de chlorophylle et la croissance cellulaire, tout en retardant la sénescence de la feuille, tout ceci au bénéfice de chacun des partenaires (Kaiser et al. 2010; Giron et al. 2013).

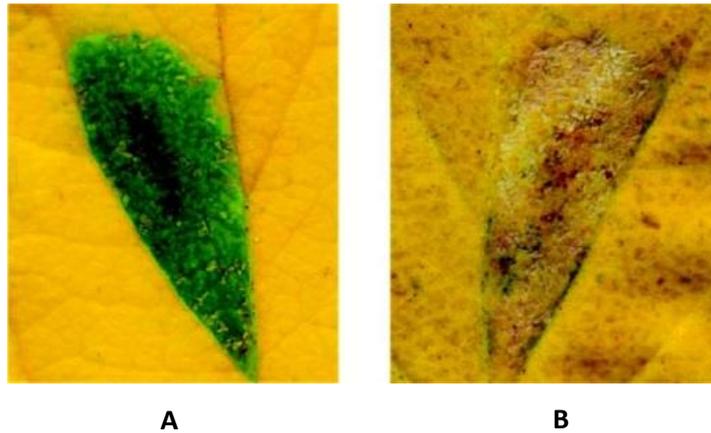


Figure 4 : Photographie de feuilles de pommiers colonisées par l'insecte *Phyllonorycter blancardella* porteur ou non des bactéries *Wolbachia*. Alors qu'un halo vert entoure l'insecte pourvu de bactéries endosymbiotiques (A), les insectes en étant dépourvus ne sont pas capables de modifier la physiologie de la plante à leur avantage (B). (Kaiser et al. 2010)

Le sol forestier est donc le siège d'une multitude d'interactions entre ses habitants. Ces interactions sont primordiales pour son bon fonctionnement et donc son équilibre.

2.5. Les métabolites secondaires dans le sol forestier

Une grande majorité des microorganismes isolés du sol produisent des métabolites secondaires tels que des molécules à activité antagoniste comme les antibactériens ou antifongiques, des sidérophores, des pigments comme les mélanines ou les caroténoïdes, etc. Ces métabolites secondaires proviennent souvent d'intermédiaires cellulaires tels que les acides aminés, les sucres, les acides gras ou encore les terpènes, qui sont condensés en des structures plus complexes via différentes voies biochimiques. Leur étude se fait actuellement majoritairement en laboratoires via des cultures sur des milieux à composition définie. Leur profil de production est connu et diverses techniques de chromatographie permettent de les purifier. L'avancée des techniques de séquençage a permis de mettre en évidence la richesse en clusters de gènes (groupement de gènes localisés en un locus et impliqués dans l'élaboration d'un même phénotype) intervenant dans la synthèse de métabolites secondaires dans les génomes bactériens. Ces clusters ont une taille qui varie de quelques kilobases à plus de 100 kb. La plupart d'entre eux contiennent des gènes de biosynthèse, des gènes de régulation et des gènes de résistance (dans le cas de clusters impliqués dans la synthèse d'antibiotique). Le nombre de clusters de gènes potentiellement impliqués dans la synthèse de métabolites secondaires excède de loin le nombre de composés connus. Cela s'explique par le fait que certaines voies de biosynthèse ne sont pas exprimées en conditions de laboratoire (Scherlach & Hertweck, 2009). À cela s'ajoute le fait que seulement 1% des bactéries par exemple ne seraient cultivables en conditions de laboratoires, les 99% restant peuvent donc être une source importante de nouvelles

molécules. L'estimation du nombre total de métabolites secondaires n'est donc pour le moment qu'arbitraire, cependant d'après les analyses réalisées en laboratoire et les estimations effectuées via l'analyse du génome de certains microorganismes, leur nombre serait considérable. À l'heure actuelle les métabolites secondaires connus présentent de nombreuses structures et des activités qui peuvent trouver des applications aussi bien dans le domaine de la santé que de l'agriculture. Cependant, leurs rôles écologiques restent encore largement méconnus (O'Brien and Wright 2011). Les métabolites secondaires sont probablement impliqués dans divers procédés comme la compétition inter-microbienne, la régulation de gènes, la communication inter-cellulaire (Davies 2006; Davies 2013) ou même la protection de l'ADN contre l'irradiation aux UV (Geng et al. 2008). Au sein des niches écologiques, l'expression du métabolisme secondaire est probablement hautement régulée et modulée par une large gamme de facteurs abiotiques et biotiques, en particulier par les nombreux organismes environnants. Le potentiel fortement diversifié des organismes à pouvoir synthétiser ces molécules aussi diverses en termes de structure que de fonction suggère qu'elles jouent un rôle majeur dans l'adaptation des organismes aux changements de leur environnement. Il est donc primordial de déterminer la place qu'occupent ces molécules au sein des interactions microbiennes dans le sol et de déterminer leurs fonctions écologiques.

La suite de l'introduction portera donc sur l'effet de l'environnement sur la synthèse de ces métabolites secondaires par les microorganismes et l'effet qu'ont ces molécules en retour sur la structuration des communautés microbiennes du sol.

3. Effet de microorganismes sur la synthèse de métabolites secondaires produits par d'autres microorganismes

Les bactéries détectent, assimilent et intègrent les différents facteurs environnementaux afin de s'adapter au mieux à leur habitat. De multiples voies de signalisation leur permettent de communiquer entre elles au sein d'une même espèce, d'espèces différentes (Konovalova and Sogaard-Andersen 2011) mais également avec d'autres microorganismes tels que des champignons. La communication peut se faire par des interactions nécessitant un contact physique direct entre les protagonistes mais également à travers la production et la détection de molécules solubles ou volatiles diffusibles dans l'environnement. En réponse à ces interactions, les microorganismes ont développé des réponses métaboliques et physiologiques complexes. Les interactions sont généralement effectuées en conditions de laboratoires c'est-à-dire sur un milieu à composition définie avec un nombre restreint de partenaires. Ce microcosme contrôlé permet dans un premier temps de mimer l'environnement et d'effectuer ainsi un premier criblage, qui constituera une première analyse des mécanismes d'interactions qui se déroulent dans le sol.

3.1. Effet des interactions par contact cellulaire sur le métabolisme secondaire

3.1.1. Induction de la production de métabolites secondaires

Les interactions par contact peuvent influencer les voies de signalisation impliquées dans le métabolisme secondaire chez certains organismes. Ainsi, des bactéries contenant des acides mycoliques dans leur membrane externe, les Corynebacteriaceae, peuvent influencer la synthèse de produits naturels chez différentes espèces de *Streptomyces* (Onaka et al. 2010). La production d'undécylprodigiosine, un antibiotique pigmenté, rouge, chez *Streptomyces lividans* TK23 est induite lors d'une coculture avec *Tsukamurella pulmonis* TP-B0596 (Figure 5). Cette dernière modifie la synthèse de composés naturels dans 88% des souches de *Streptomyces* isolées du sol. D'autres corynebactéries comme *Rhodococcus erythropolis* et *Corynebacterium glutamicum*, influencent respectivement la biosynthèse de 87,5% et 90,2% des souches de *Streptomyces*. L'addition d'acide mycolique purifié n'a pas d'effet sur la production du pigment chez *S. lividans*, ce qui suggère que ces composés seuls ne sont pas suffisants à l'induction du métabolisme secondaire, les cellules de *T. pulmonis* TP-B0596 doivent être intactes.

L'interaction par contact ne nécessite pas toujours de cellules vivantes. Ainsi, l'introduction de cellules de *Bacillus subtilis* ou *Staphylococcus aureus* tuées par la chaleur à des cultures de *S. coelicolor* stimulent la production d'undécylprodigiosine (Luti and Mavituna 2010). La question se pose alors de savoir quel composé stimule le métabolisme secondaire chez ces bactéries. *B. subtilis* et *S. aureus* possèdent des parois cellulaires constituées majoritairement de peptidoglycane, ce dernier assurant la forme de la cellule bactérienne. Peterson et al (2006) ont décrit un possible rôle de cette molécule en tant que molécule de signalisation. En effet, dans leurs travaux, les auteurs ont découvert et montré que la croissance de bactéries de la rhizosphère peut être stimulée par ajout dans le milieu de peptidoglycane purifié provenant de *Bacillus cereus* (Peterson et al. 2006). Cependant ni l'ajout de peptidoglycane, ni l'ajout de N-acétylglucosamine (GlcNAc), l'un des deux principaux composants du peptidoglycane, n'entraîne de stimulation de la production d'undécylprodigiosine chez *S. coelicolor* dans les conditions testées. *S. coelicolor* a donc peut-être reconnu certaines protéines ou récepteurs à la surface de ces cellules qui peuvent ne pas avoir été altérés par la chaleur.

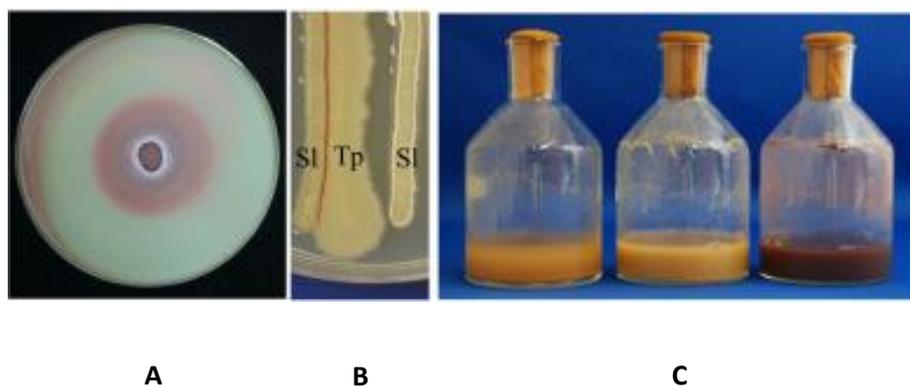


Figure 5 : Induction de la production d'undécylprodigiosine par *T. pulmonis* en coculture avec *S. lividans* TK23. **(A)** Coculture entre *T. pulmonis* et *S. lividans* en milieu Bennett. Les spores de *S. lividans* ont été étalées sur toute la surface du milieu gélosé et *T. pulmonis* a été inoculée au centre de la boîte. **(B)** *S. lividans* et *T. pulmonis* ont été inoculées en parallèle sur le milieu. Sl, *S. lividans*; Tp, *T. pulmonis*. La production de pigment rouge est observée seulement au niveau du contact cellulaire. **(C)** Milieu liquide sans bactérie (à gauche), culture de *S. lividans* (centre) et coculture entre *T. pulmonis* et *S. lividans* (à droite). (Onaka et al. 2010)

3.1.2. Induction de la synthèse de nouveaux métabolites secondaires

Dans le cadre de l'étude avec les Corynebacteriaceae citée précédemment, les auteurs ont mis en évidence que *T. pulmonis* induisait la production d'un nouvel antibiotique, l'alchivemycine A, chez *Streptomyces endus* S-522.

Une interaction par contact peut même aller jusqu'à moduler la régulation épigénétique de certains clusters de gènes impliqués dans la synthèse de métabolites secondaires. Ainsi, une interaction physique intime entre le champignon *Aspergillus nidulans* et la bactérie isolée du sol, *Streptomyces rapamycinicus*, conduit à l'activation du cluster de gènes *ors*, codant une PKS (PolyKetide Synthase), jusqu'à présent non exprimé chez le champignon en conditions de laboratoire (Schroeckh et al. 2009) (Figure 6). Le cluster *ors* est impliqué dans la production de l'acide orsellinique et deux de ses dérivés, des inhibiteurs de cathepsines K.

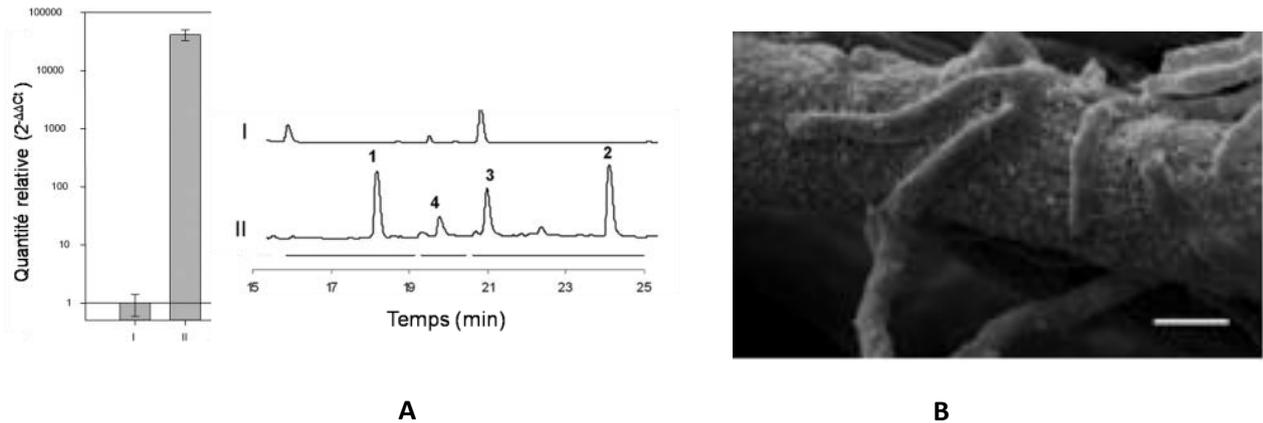


Figure 6 : Influence de *S. rapamycinicus* sur le métabolisme secondaire d'*A. nidulans* par contact physique. (A) Quantité relative d'ARNm déterminée par qRT-PCR du gène *orsA* codant une synthase intervenant dans la production de l'acide orsellinique (OA), de l'acide lécanorique (LA) et des inhibiteurs de cathepsines F-9775A et F-9775B. Profils HPLC correspondant aux surnageants de cultures. La quantité relative est donnée comme le log₂ de $-\Delta\Delta Ct$. I : culture de *A. nidulans* II : coculture entre *A. nidulans* et *S. rapamycinicus*. 1 : OA 2 : LA 3 : F-9775A et 4 : F-9775B. (B) photo de microscopie électronique montrant l'interaction directe entre la bactérie *S. rapamycinicus* et le mycélium du champignon *A. nidulans* (échelle : 1 μ m)(Schroeckh et al. 2009).

Le contact entre les deux organismes déclenche une acétylation spécifique des histones du cluster *ors* par le complexe Saga/Ada qui contient l'histone acétyltransférase GcnE et la protéine AdaB, des sous-unités core essentielles du complexe (Reyes-Dominguez et al. 2008; Nützmann et al. 2011). L'acétylation des histones est un mécanisme connu d'activation d'expression de certains gènes.

Les interactions physiques entre microorganismes ont donc un impact fort sur l'expression du métabolisme secondaire des communautés microbiennes du sol. Cependant, certaines interactions ne font pas intervenir de contact direct intime entre les bactéries et leurs partenaires mais impliquent plutôt des molécules diffusibles telles que des molécules solubles ou volatiles.

3.2. Effet des interactions chimiques sur le métabolisme secondaire

3.2.1. Effet de molécules sécrétées sur le métabolisme secondaire

3.2.1.1. Impact sur la synthèse de métabolites secondaires

Tout comme les interactions par contact, les interactions microbiennes médiées chimiquement peuvent stimuler la synthèse d'un métabolite secondaire voire même déclencher la synthèse de produits encore non identifiés jusqu'à présent (Schäberle et al. 2014). Des interactions chimiques interspécifiques peuvent stimuler la morphogénèse et/ou

le métabolisme secondaire chez certaines espèces de *Streptomyces* (Ueda et al. 2000). Des tests de « cross-feeding » avec 76 souches de *Streptomyces* ont révélé que 20 % d'entre elles présentent des réponses à des métabolites putatifs excrétés par d'autres souches. Ces interactions entraînent un développement précoce des colonies et/ou une production accrue des métabolites secondaires tels que des sidérophores desferrioxamines dans certains cas.

L'utilisation de nouvelles techniques de spectrométrie de masse comme le NanoDESI ou le MALDI-TOF ont permis d'approfondir les connaissances sur les changements métaboliques globaux au cours des interactions bactériennes. Les échanges métaboliques entre *S. coelicolor* A3(2) et cinq actinomycètes, *Amycolatopsis* sp.AA4 et quatre souches de *Streptomyces*, ont été analysées en utilisant ces nouvelles techniques (Traxler et al. 2013). Plus de 200 composés ont pu être différentiellement associés à *S. coelicolor* au travers de ces cinq interactions et douze nouveaux sidérophores, des agents de chélation, de type desferrioxamines ont été découverts. De plus, la production de ces sidérophores étant dépendante du partenaire de *S. coelicolor*, cela signifie qu'il y a mise en place d'une réponse spécifique adaptée.

Un autre exemple de l'influence de la communication chimique sur la production de métabolite secondaire est celui de *B. subtilis* qui est capable de s'adapter à de nombreux environnements en partie grâce aux nombreux composés bioactifs qu'il produit. Un de ces composés, le bacillaene est un polycétide linéaire qui inhibe la production des molécules à activité antagoniste de type prodiginines chez *S. coelicolor* par contre il stimule leur production chez *S. lividans* (Vargas-Bautista et al. 2013).

3.2.1.2. Interactions chimiques et réponse écologique

D'autres interactions chimiques, en plus de révéler une induction de la synthèse de métabolites secondaires chez l'un des partenaires via un facteur soluble, ont permis d'aller plus loin dans la compréhension du rôle « écologique » de cette réponse. Bien que les expériences aient toujours été réalisées *in vitro*, elles ont tout de même permis d'apporter un premier éclairage sur le fonctionnement des interactions microbiennes au sein de l'écosystème sol.

La confrontation entre *S. coelicolor* A3(2) et un autre habitant du sol, la protéobactérie *M. xanthus*, déclenche la production de l'antibiotique actinorhodine chez *S. coelicolor* ainsi que la formation du mycélium aérien (Perez et al. 2011). Ces phénotypes ne sont pas dépendants d'un contact cellulaire car une souche de *M. xanthus* non mobile mise en présence de *S. coelicolor* déclenche également le phénomène d'induction (Figure 7). *Myxococcus* produirait un facteur soluble, encore inconnu, déclenchant la production d'actinorhodine. Il reste à savoir si c'est le même facteur soluble qui déclenche la différenciation morphologique du *Streptomyces*. *M. xanthus* est un prédateur motile, capable de consommer d'autres microorganismes et même des vers. Les auteurs ont montré

qu'après avoir détecté sa présence, *S. coelicolor* produirait alors l'actinorhodine en tant qu'agent répulsif. Cette réponse lui permettrait donc de se protéger contre d'éventuels agresseurs dans son environnement.

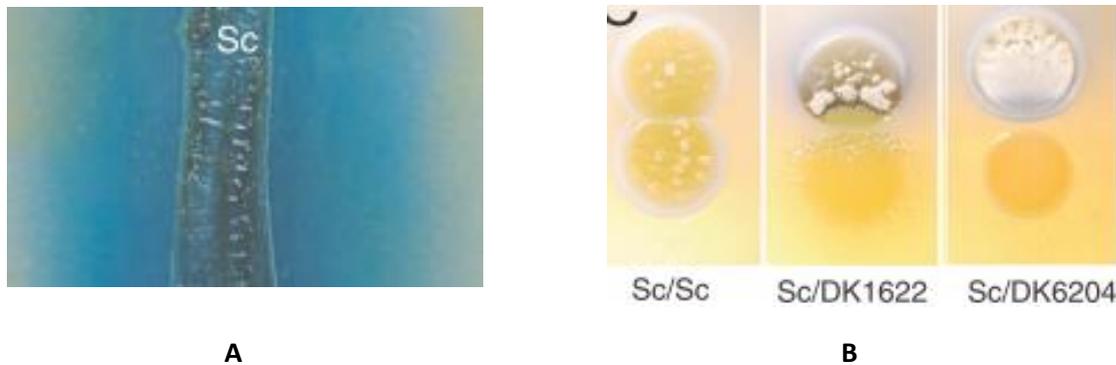


Figure 7: Stimulation de la production d'actinorhodine et du développement aérien de *S. coelicolor* en réponse à *M. xanthus*. (A) Réalisation d'une strie de *S. coelicolor* (Sc) sur milieu gélosé préalablement ensemencé avec un tapis de *M. xanthus*. La photo a été prise après 120h d'incubation. (B) Les cellules de *S. coelicolor* ont été mises en présence de deux souches de *M. xanthus*, la souche sauvage (DK1622) et un mutant non mobile (DK6204). Le témoin correspond à la confrontation entre *S. coelicolor* et *S. coelicolor*. Les photos ont été prises après 72h d'incubation. (Perez et al. 2011)

Les bactéries du sol sont fortement consommées par les prédateurs de type protozoaire. De nombreuses bactéries ont donc développé des stratégies de défenses telles que la production d'exométabolites toxiques. Cependant, la production de toxines est coûteuse en énergie et est susceptible d'être ajustée en fonction du risque de prédation pour équilibrer les coûts et les avantages. L'ajout du surnageant d'une culture de l'amibe *Acanthamoeba castellanii* à une culture de *P. fluorescens* CHA0 conduit à une augmentation de la toxicité de la bactérie contre les amibes. Après quelques minutes, il y a augmentation de l'expression de la plupart des gènes impliqués dans la biosynthèse de toxines extracellulaires chez *P. fluorescens*. Des composés chimiques, solubles dans l'eau, seraient responsables de l'induction de la réponse de la défense bactérienne (Jousset et al. 2010).

Jusqu'à présent nous avons vu des exemples où l'impact de l'environnement sur le métabolisme secondaire des bactéries est en quelque sorte unidirectionnel. Cependant, dans certains cas, un effet ping pong peut se mettre en place. Un véritable dialogue moléculaire s'établit alors entre les partenaires microbiens.

3.2.1.3. Interactions chimiques et dialogue moléculaire

Dans le cas des *Streptomyces* auxiliaires de la mycorhization, des signaux sont émis par les bactéries et reconnus par les champignons. La molécule la mieux caractérisée à l'heure

actuelle est l'auxofurane, molécule soluble structurellement proche de l'auxine, produite par *Streptomyces* AcH 505 (Riedlinger et al. 2006). Ce signal induit des modifications de la transcription de gènes du champignon *Ammanita muscaria*, codant notamment des protéines impliquées dans le métabolisme primaire, la régulation de la transcription, le cytosquelette ou le métabolisme lipidique. Il s'agit bien d'une régulation en *trans* voire même d'un dialogue moléculaire qui s'installe puisque, en réponse à cette interaction, la production d'auxofurane est augmentée d'un facteur 4 chez *Streptomyces* AcH 505. De même, le champignon réprime la biosynthèse des antibiotiques WS-5995 B et WS-5995 C chez la bactérie via la production d'acides organiques.

La souche auxiliaire de mycorhization *Pseudomonas fluorescens* BBc6R8, bactérie étudiée au cours de ce travail, stimule la croissance pré-symbiotique et la survie du champignon *L. bicolor* S238N. Ceci stimule la formation de l'ectomycorhize avec le pin Douglas Fir. Le champignon ectomycorhizien améliore la survie de la souche bactérienne auxiliaire. Les métabolites impliqués dans cette interaction sont le tréhalose et la thiamine. Le tréhalose, un disaccharide, s'accumule fortement dans les hyphes fongiques, il sert de chimio-attractant et stimule la croissance de la souche auxiliaire. En parallèle, *P. fluorescens* BBc6R8 produit la thiamine, une vitamine, qui stimule la croissance fongique *in vitro*. L'interaction entre les deux organismes est donc à bénéfice réciproque (Deveau et al. 2010). C'est en quelque sorte un mutualisme trophique (Figure 8).

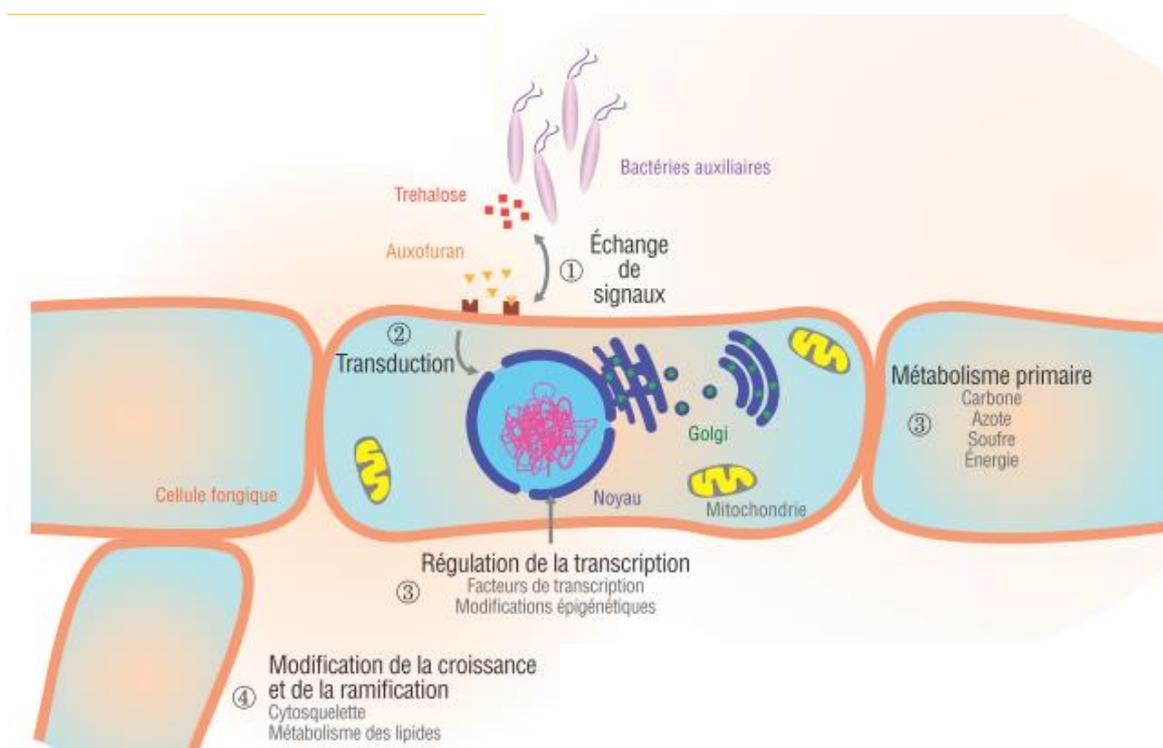


Figure 8 : Mécanismes moléculaires de la réponse fongique aux stimuli des bactéries auxiliaires de la mycorhization. Les deux partenaires échangent des signaux, tels que l'auxofurane bactérien ou le tréhalose fongique. Ces molécules signal sont reconnues par le champignon, activent des voies de transduction de signaux et induisent des modifications de la transcription de gènes fongiques, codant notamment pour des protéines impliquées dans le métabolisme primaire, la régulation de la transcription, le cytosquelette ou le métabolisme lipidique. Ces modifications aboutissent à l'échelle macroscopique à une modification de la croissance et de la ramification du mycélium. (Deveau et al. 2008)

Les nouvelles méthodologies d'IMS telles que le MALDI-TOF ont permis de mettre en évidence que la production de certains métabolites, comme les antibiotiques ou les sidérophores, chez *S. coelicolor*, est fortement influencée par l'interaction avec *B. subtilis*. En retour, la souche de *Streptomyces* est capable de moduler la production de métabolites chez *B. subtilis* (Yang et al. 2009; Watrous et al. 2012).

Pour l'ensemble de ces interactions, l'éliciteur reste encore très souvent inconnu bien qu'il ait été déterminé tout de même que ce soit une molécule soluble diffusible qui entre en jeu. Cependant dans d'autres interactions notamment entre bactéries et champignons, il a été mis en évidence que ce serait des molécules détachées de la paroi fongique qui seraient responsables de l'induction de la production d'un métabolite secondaire chez la bactérie.

3.2.2. Effet de molécules issues de la paroi de microorganismes sur le métabolisme secondaire

La paroi fongique est une structure multicouche composée à 80% de polysaccharides dont font partie la chitine et les glucanes. La chitine est un homopolymère linéaire de β -1,4 N-acétyl-glucosamine. Les glucanes sont des polymères de glucose liés entre eux par des liaisons β -1,6 (Robert and Catesson 2000). La paroi est également constituée de protéines, de lipides, de pigments et de sels minéraux. Sa composition varie en fonction des espèces et des conditions environnementales.

3.2.2.1. Effet de polymères pariétaux sur le métabolisme secondaire

Des analyses de puces à ADN ont révélé que l'expression de gènes du métabolisme secondaire est induite lorsque de la chitine est ajoutée à des cultures de *S. coelicolor* A3(2) réalisées sur du sol préalablement autoclavé (Nazari et al. 2013). La chitine stimule la production d'antibiotiques seulement lors de cultures bactériennes en milieu sol ou sur milieu gélosé contenant de l'extrait de sol. L'addition de chitine à un milieu minimum n'a pas d'effet sur la production d'antibiotique chez *S. coelicolor* A3(2). Ceci signifie qu'il pourrait y avoir d'autres facteurs solubles au niveau du sol qui induirait la production de métabolites secondaires chez *S. coelicolor* A3(2) en présence de chitine. Ainsi, la chitine peut donc être la source même de l'induction du métabolisme secondaire. Les Streptomycètes sont connues

pour décomposer la chitine. En effet, elles possèdent de nombreux gènes codant différentes chitinases (Saito et al. 2003). L'addition de chitine stimule l'expression de ces gènes, cependant d'autres facteurs seraient également impliqués dans cette induction, tels que l'allosamidine. Cette dernière stimule fortement la transcription et la production de chitinases chez diverses espèces de *Streptomyces* en présence de chitine (Suzuki et al. 2008). Ainsi dans le cadre d'une interaction avec un champignon, cette induction du métabolisme secondaire pourrait permettre à *Streptomyces* de rentrer en compétition avec d'autres organismes afin de protéger des ressources nutritives par exemple. *Streptomyces* pourrait également détecter la présence d'un champignon via la chitine, enclencher la production d'enzymes de dégradation et ainsi avoir directement accès aux oligomères et monomères dérivés de chitine comme source nutritive.

3.2.2.2. Effet d'oligomères pariétaux sur le métabolisme secondaire

La production de l'antifongique tolytoxine par la cyanobactérie *Scytonema ocellatum* est stimulée par des homogénats cellulaires des champignons *Penicillium notatum* et *Cylindrocladium spathiphylli* (Patterson and Bolis 1997). L'activité d'éliciteur serait plutôt médiée par un composant soluble, tel qu'un oligomère de chitine. En effet des fragments de chitine stimulent plus la production de tolytoxine que le polymère lui-même. Ceci pourrait suggérer que *S. ocellatum* relargue une enzyme qui est capable de dégrader la chitine en oligomères ce qui déclencherait alors l'accumulation physiologique de tolytoxine. Cet antifongique pourrait avoir un rôle écologique en tant qu'agent de défense chimique inductible capable de protéger *S. ocellatum* contre l'invasion de champignons.

D'autres exemples dans la littérature présentent l'effet d'oligosaccharides sur la stimulation de métabolites secondaires. C'est le cas d'oligosaccharides dérivés de pectine ou d'alginate (Asilonu et al. 2000; Murphy et al. 2008). L'addition de 50 à 100 µg de ces composés dans des cultures du champignon *Penicillium chrysogenum* ATCC 9480 conduit à l'augmentation de la production du pigment chrysogénine. De même l'augmentation de la production de l'antibactérien benzylpenicilline est observée en présence d'oligosaccharides tels que des oligomannuronates et oligoguluronates chez *Penicillium chrysogenum* (Ariyo et al. 1997). L'addition de ces oligosaccharides stimule la production des antibiotiques oxytétracycline chez *Streptomyces* spp. (Sangworachat 2006) et bacitracine A chez *Bacillus licheniformis* (Murphy et al. 2008).

3.2.2.3. Effet de monomères pariétaux sur le métabolisme secondaire

La signalisation peut également impliquer des molécules plus petites que des oligosaccharides. En effet, l'équipe de S. Rigali a montré que le N-acétyl-glucosamine (GlcNAc) peut être, via le régulateur central DasR, un composé central influençant le métabolisme secondaire de certains *Streptomyces*. En effet, en période de carence nutritionnelle, l'accumulation de GlcNAc provenant de l'hydrolyse de la paroi cellulaire du

Streptomyces déclencherait le développement et la production d'antibiotiques chez différentes espèces de *Streptomyces*. Cependant, la présence de GlcNAc issu de la chitine, un des composants de la paroi fongique, bloque le développement de ces bactéries. Ce réglage fin permet à l'organisme de recruter un composé omniprésent comme molécule de signalisation, et de décider entre la croissance ou la sporulation (Rigali et al. 2008). Le GlcNAc inhibe, par exemple, la production de sidérophores chez *S. coelicolor* A3(2) via la levée de la répression transcriptionnelle par DasR du gène *dmdR* qui code un répresseur de l'utilisation du fer.

Différents composants pariétaux, des polymères aux monomères, peuvent ainsi être des facteurs régulant le métabolisme secondaire des bactéries. D'autres molécules diffusibles, appelées molécules signal, ont également un rôle primordial dans ces mécanismes de régulation.

3.2.3. Quorum sensing et métabolisme secondaire

3.2.3.1. Quorum Sensing ou système d'auto-induction

Les bactéries produisent un large répertoire de molécule signal. Ces molécules sont des composés organiques de faible poids moléculaire qui présentent une diversité fonctionnelle et chimique (Visick and Fuqua 2005). Suite à des stimuli environnementaux et physiologiques, les molécules signal sont synthétisées et déclenchent alors des cascades de transduction de signaux ce qui permet de coordonner et de moduler l'expression de gènes cibles afin de mettre en place une réponse adaptée et rapide des bactéries à leur environnement (Atkinson and Williams 2009). Ces systèmes de communication permettent ainsi de moduler les activités métaboliques des communautés microbiennes et leurs interactions (Yim et al. 2006). Les premiers mécanismes de communication ou signalisation identifiés ont été décrits comme étant des systèmes d' « autoinduction ». Ce terme provient de l'observation que la bactérie est elle-même la source du signal qu'elle reçoit. Dans ces systèmes, les molécules signal déclenchent une modification de l'expression des gènes en réponse notamment aux fluctuations de la densité de la population bactérienne (Fuqua et al. 1994; Visick and Fuqua 2005). Ce procédé, nommé quorum sensing (QS), contrôle, à travers l'utilisation d'un large répertoire de molécules diffusibles, divers phénotypes chez les bactéries (Romero et al. 2011). Parmi les molécules les plus représentées, peuvent être citées les AHL (Acyl-Homosérines Lactones) chez les protéobactéries et les peptides signaux chez les bactéries Gram-positives. Les AHL produites par exemple par *Pseudomonas aeruginosa* contrôlent la production d'exoenzymes, de métabolites secondaires, la virulence et la formation de biofilm. Parallèlement à ces catégories les plus étudiées, d'autres signaux moléculaires ont été découverts permettant ainsi d'agrandir la collection de molécules signal déjà existantes (Camilli and Bassler 2006) comme des dipeptides cycliques par exemple. Chez le phytopathogène *Xanthomonas campestris*, la molécule DSF (Diffusible Signaling Factor), un acide gras insaturé, impliqué dans la synthèse de facteurs de virulence et de pigment a été mis en évidence. Chez les bactéries Gram-positives du genre *Streptomyces*, le

métabolisme secondaire voire même la différenciation morphologique sont régulées par des molécules de la famille des gamma-butyrolactones (γ -butyrolactones). Cependant, d'autres molécules sont également retrouvées comme le facteur PI (2,3-diamino-2,3-bis (hydroxyméthyl)-1,4-butanediol), produit par *Streptomyces natalensis*, qui permet d'induire la production de l'antifongique pimarinine.

Ces quelques exemples révèlent la complexité des systèmes de communication mis en place par les bactéries. La signalisation moléculaire apparaît donc importante voir même nécessaire à l'adaptation des bactéries à leur écosystème. En effet, les molécules signal font partie des nombreux signaux environnementaux que la bactérie doit intégrer pour déterminer sa stratégie optimale de survie. Quelles que soient les conditions de croissance choisies au laboratoire, plus de la moitié des gènes des microorganismes semblent ne pas être nécessaires. Ainsi, nombre des activités métaboliques bactériennes pourraient aider ces organismes à prospérer en modifiant leur milieu permettant ainsi l'adaptation à leur milieu environnant. Les signaux moléculaires bactériens feraient donc partie des forces organisatrices des communautés bactériennes au sein des différents écosystèmes colonisés.

3.2.3.2. Le quorum sensing chez les bactéries Gram négatives

Chez les bactéries à Gram négatives, le quorum sensing est souvent médié par des molécules de type AHL (Greenberg 2000). Ce procédé de régulation a été découvert en premier chez la bactérie *Vibrio fischeri*. Cette bactérie forme des symbioses mutualistes avec certains organismes, elle est présente à l'intérieur d'organes bioluminescents (Nealson and Hastings 1979; Ruby 1996). Le quorum sensing est justement impliqué dans le contrôle de cette bioluminescence (Figure 9). Au cours de la croissance, les bactéries produisent, via la synthétase LuxI, des molécules de type AHL. Lorsque la densité bactérienne atteint un certain seuil, l'accumulation des molécules signal dans le milieu induit le système *lux*. Les AHL capables de diffuser à travers la membrane bactérienne se fixent alors à la protéine cytoplasmique LuxR et l'activent. Cette dernière qui est un régulateur transcriptionnel peut alors activer l'expression de ces gènes cibles c'est-à-dire l'opéron de gènes *luxCDABEG*. Ceci aboutit à la synthèse de LuxA et LuxB qui forment la protéine luciférase et à la synthèse de LuxC, D et G qui sont impliqués dans la production du substrat de la luciférase, le tétradécane. Il y a alors émission de luminescence.

Des mécanismes, comme la synthèse de facteurs de virulence par les bactéries du sol, peuvent également être régulés par un mécanisme de QS, c'est le cas chez des pathogènes de plantes tels que *Erwinia carotovora* (Pirhonen et al. 1993) ou encore *P. aeruginosa* (Rahme et al. 1995).

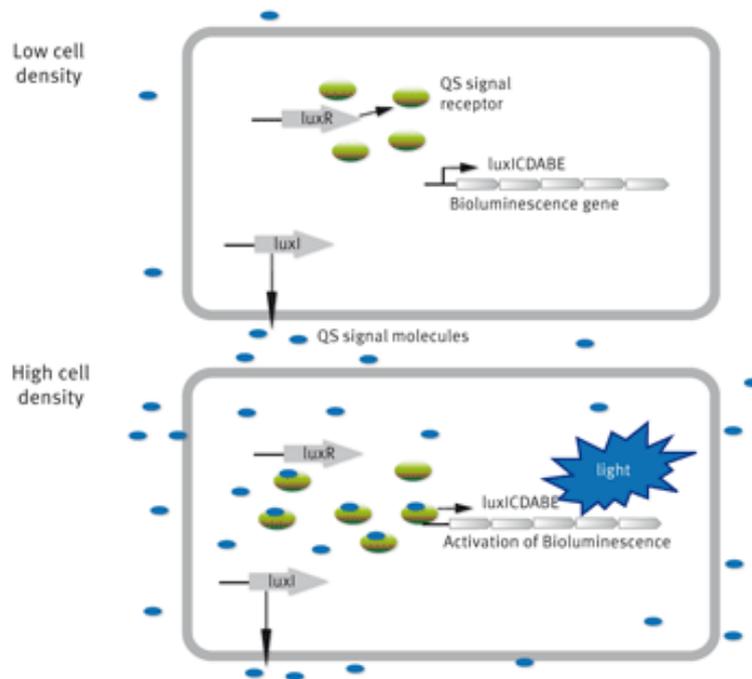


Figure 9 : Schéma du mécanisme de quorum sensing médié par les AHL chez *Vibrio fischeri*

3.2.3.3. Le quorum sensing chez les bactéries Gram positives

L'une des premières molécules signal caractérisées dans le monde bactérien est une molécule de la famille des γ -butyrolactones. Il s'agit du facteur A (2-isocapryloyl-3R-hydroxymethyl-gama-butyrolactone) de *Streptomyces griseus* (Khokhlov et al. 1966). Ces molécules sont produites par certaines bactéries du sol comme les Streptomycètes et par certains autres genres d'Actinomycètes comme *Kitasatospora setae*. Elles sont considérées comme des molécules de QS. Le facteur A régule à la fois le métabolisme secondaire dont la production de streptomycine et la différenciation morphologique (Horinouchi 2007). La cascade de régulation déclenchée par cette molécule a été étudiée permettant ainsi la mise en place d'un modèle. Au cours de la croissance de la bactérie, le gène codant l'activateur transcriptionnel global AdpA est réprimé par le répresseur transcriptionnel ArpA. Lorsque le facteur A atteint une concentration seuil (10^{-9} M), il se lie à ArpA qui se dissocie alors de son gène cible *adpA*. Ce dernier peut donc être exprimé et permettre ainsi l'expression de gènes impliqués dans la production d'antibiotiques et la différenciation morphologique chez *S. griseus* (Ohnishi et al. 2005) (Figure 10).

Contrairement au facteur A, la plupart des γ -butyrolactones contrôlent uniquement le métabolisme secondaire. Ces molécules peuvent alors être dédiées à la régulation de la production d'un seul antibiotique, comme par exemple la γ -butyrolactone VB qui contrôle la production de virginiamycine chez *Streptomyces virginiae*. Elles peuvent également présenter des effets pléiotropes comme chez *Streptomyces lavendulae* chez laquelle IM-2

contrôle la production d'antibiotiques (nucléosides et D-cyclosérine) et d'un pigment bleu, l'indigoidine (Takahashi et al. 2007; Komatsu et al. 2010). Contrairement à l'effet positif exercé par les autres γ -butyrolactones, IM-2 est une exception car elle permet à la fois d'activer la production des nucléosides et du pigment mais aussi de réprimer la production de D-cyclosérine (Kitani et al. 2010). Enfin, la molécule SCB1 contrôle la production de l'antibiotique coelimycine et du pigment jaune associé mais également des antibiotiques actinorhodine et undécylprodigiosine chez *S. coelicolor*..

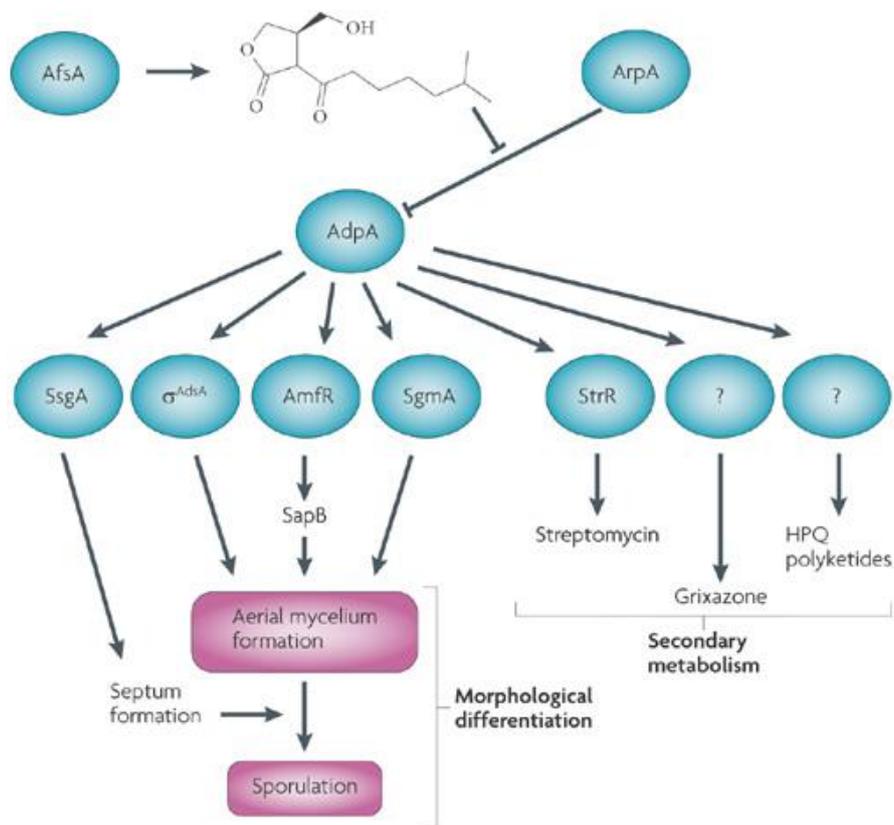


Figure 10 : Schéma de la cascade de signalisation médiée par le facteur A chez *S. griseus*. (Flardh and Buttner 2009)

Récemment, le groupe de G. Challis de l'Université de Warwick a reporté la découverte d'une nouvelle classe de molécules de signalisation chez *S. coelicolor* A3(2). Ces molécules jouent un rôle dans la régulation de la biosynthèse de l'antibiotique méthylénomycine (Mm) (Corre et al. 2008; O'Rourke et al. 2009). L'identification et l'élucidation de la structure de ces molécules a révélé la présence d'une famille de 5 nouveaux composés, les 2-alkyl-4-acides hydroxyméthylfurane-3-carboxyliques (AHFCAs) différant dans l'identité du groupe alkyl en position C2 (Corre et al. 2008). Ces derniers ont été appelés « MéthylénoMycine Furannes » (MMFs) car ils induisent la production de l'antibiotique Mm et partagent une structure de base furane. Un opéron de trois gènes, l'opéron *mmfLHP*, présent au sein du cluster de synthèse de la Mm est responsable de la biosynthèse de ces molécules signal. Des analyses génomiques ont révélé que les composés de type MMFs pourraient être produits

par d'autres espèces. Par exemple, la présence d'un cluster de trois gènes homologues au locus *mmfLHP* a été identifié chez *Streptomyces avermitilis* (Corre et al. 2008). Ceci suggère que les furannes pourraient former une classe répandue d'inducteurs de la biosynthèse d'antibiotiques chez les *Streptomyces*, avec des fonctions analogues aux γ -butyrolactones ou même aux avénolides, famille de molécules signal connue pour réguler le métabolisme secondaire chez *Streptomyces*.

3.2.3.4. Régulation croisée entre molécules de QS

Dans la nature, les bactéries se développent en communautés polymicrobiennes. L'interaction au sein de ces communautés implique une signalisation inter-espèces qui peut être médiée par des molécules signal telles que l'autoinducer-2 (AI-2). En effet, c'est l'un des rares signaux à être produit à la fois par les bactéries Gram positives et Gram négatives (Schauder and Bassler 2001). Les bactéries peuvent également moduler leur comportement en réponse à des signaux cellulaires qu'elles ne synthétisent pas mais qui sont produits par d'autres organismes environnants. Un exemple est celui de l'indole et de ses dérivés. L'indole, répandu chez les plantes et les bactéries du sol (Morris 1987; Patten and Glick 1996; Theunis et al. 2004), influence positivement la formation de biofilm chez *P. fluorescens* et *P. aeruginosa* alors que ces dernières ne produisent pas ce signal (Lee et al. 2007).

Enfin, certains microorganismes via la synthèse de petites molécules solubles sont capables d'activer le système de quorum sensing présent chez leurs partenaires. C'est ce qui est observé lors de l'interaction entre *Enterobacter* sp. et *P. aeruginosa*. *P. aeruginosa* présente au moins trois systèmes de quorum sensing, Las, Rhl et Pqs. Les molécules N-(3-oxododecanoyl) L-homosérine lactone (3-oxo-C12-HSL), N-butanoyl L-homosérinelactone (C4-HSL) et 2-heptyl-3-hydroxy-4-quinolone (PQS) sont utilisées comme molécules d'auto-induction dans ces systèmes. Ces systèmes de QS régulent la synthèse de plusieurs facteurs de virulence, incluant la pyocyanine et les rhamnolipides. Ces facteurs de virulence sont connus pour être des antimicrobiens. Les auteurs ont révélé qu'un dialogue moléculaire se mettait en place entre les deux bactéries. *Enterobacter* sp. après avoir reconnue *P. aeruginosa*, produirait des molécules telles que des dicétopipérazines (DKPs) connues pour activer les systèmes biosenseurs de type AHL, ce qui permettrait ainsi de stimuler le système de QS médié par les C4-HSL et donc la production de pyocyanine chez *P. aeruginosa*. *Pseudomonas* sp. et *Enterobacter* sp. ont déjà été identifiés ensemble au sein de biofilms microbiens en présence d'autres agents pathogènes (Angell et al. 2006).

Le mécanisme de QS a un rôle prédominant dans la régulation de la physiologie et du métabolisme bactérien. Il est donc devenu une cible de premier choix dans des environnements compétitifs tel que le sol.

3.2.4. Quorum quenching et métabolisme secondaire

3.2.4.1. Quorum Quenching ou comment contrer le QS

Des bactéries ont développé, au cours de l'évolution, des mécanismes dits de " Quorum Quenching (QQ) " afin d'interférer avec le QS (Waters and Bassler 2005; Faure et al. 2009). Le terme de quorum quenching englobe divers phénomènes naturels ou des procédures d'ingénierie qui conduisent à la perturbation de l'expression des fonctions régulées par QS. Il existe trois stratégies phares de QQ (Figure 11A) : arrêter la production de la molécule signal en ciblant l'enzyme impliquée dans sa synthèse telle que l'AHL synthétase, sécréter des enzymes qui dégradent la molécule signal ou enfin produire de petites molécules antagonistes qui rentrent en compétition en se liant au récepteur de la molécule signal (Koh et al. 2013). Les trois principales étapes de la régulation par QS qui sont ainsi ciblées sont la synthèse, la stabilité et la détection de la molécule signal. Les facteurs de QQ interviennent donc également dans la régulation du métabolisme secondaire au sein d'une communauté microbienne.

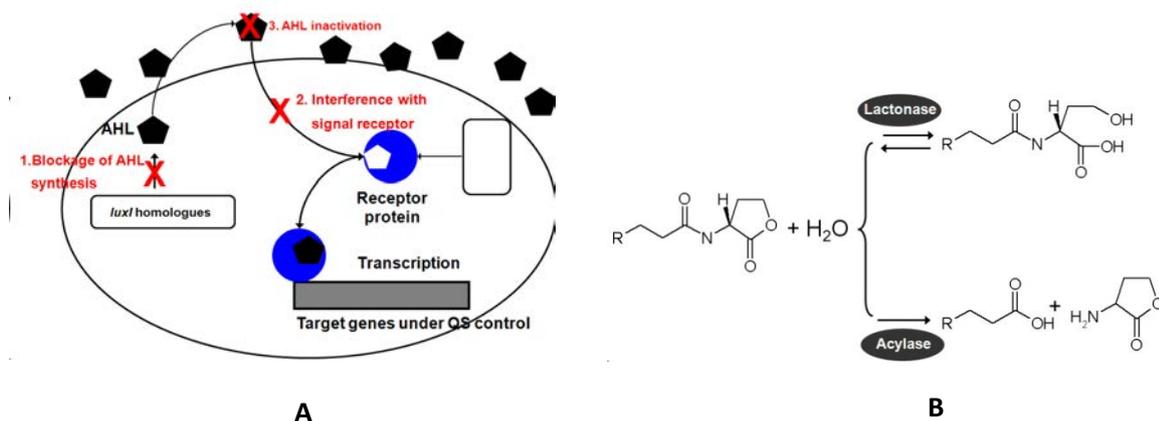


Figure 11 : Mécanismes de Quorum Quenching. (A) Schéma des différentes stratégies de Quorum Quenching. (B) Dégradation d'une AHL par une lactonase ou une acylase.

3.2.4.2. Empêcher la production des molécules signal

Les composés volatiles se dispersent facilement dans l'atmosphère et jouent un rôle écologique essentiel dans les habitats « hors sol ». Ce n'est que depuis peu, qu'il a été mis en évidence que des organismes du sous-sol produisaient également de nombreuses molécules volatiles. C'est pourquoi, de nombreuses recherches se focalisent à présent sur les interactions du sol impliquant des molécules volatiles (Effmert et al. 2012).

Les composés volatiles peuvent interférer avec les communications bactériennes. Ils peuvent influencer certaines voies de signalisation de QS médiées par des N-acyl homosérines lactones (Schulz et al. 2010). Ainsi, les composés volatiles produits par *P. fluorescens* et *Serratia plymuthica* inhibent le QS chez d'autres bactéries telles que *Agrobacterium*,

Chromobacterium, *Pectobacterium* et *Pseudomonas* via l'inhibition de la transcription de gènes codant des synthèses de N acyl-homosérine lactones (Effmert et al. 2012).

3.2.4.3. Dégrader les molécules signal

Comme cité précédemment, les signaux de QS peuvent être soumis à une dégradation enzymatique (Figure 11B). Par exemple, des AHL lactonases, produites par *Bacillus*, permettent d'ouvrir le cycle lactone des molécules de type AHL (Dong et al. 2001; Dong and Zhang 2005; Julia Pedroza et al. 2014). Par exemple, *B. subtilis* inhibe la production de l'antibiotique streptomycine chez *S. griseus* via la synthèse d'une lactonase. C'est un mécanisme de QS impliquant une γ -butyrolactone qui contrôle la synthèse de cet antibiotique chez *S. griseus* (Schneider et al. 2012).

Les enzymes acylases/amidohydrolases convertissent les AHL en homosérine lactone et acide gras. De nombreuses bactéries inactivent les AHL (Faure and Dessaux 2007) telles que les α -protéobactéries, *Agrobacterium*, les β -protéobactéries, *Ralstonia* et les γ -protéobactéries, *Pseudomonas*. Mis à part les bactéries, les capacités de dégradation des AHL ont également été observées chez les animaux (Chun et al. 2004) et chez les plantes (Delalande et al. 2005).

3.2.4.4. Entrer en compétition avec les molécules signal

Les molécules qui miment les signaux de QS ont été découvertes chez les plantes et les bactéries. La production d'inhibiteurs du QS peut être une méthode plus simple que de la production d'antibiotiques où il faut un système de résistance chez le producteur (Wietz et al. 2013). Chez *P. aeruginosa*, la molécule de signalisation PQS est reconnue par la protéine PqsR. Cette liaison dissocie PqsR des promoteurs de ses gènes cibles, entraînant alors l'expression de ces gènes. Ceci aboutit à la production de PQS et des facteurs de virulence tels que l'élastase, les rhamnolipides, la pyocyanine ou les vésicules membranaires (Tashiro et al. 2013). Il a été mis en évidence que des composés pouvaient affectés la signalisation du PQS. En effet, le farnésol, produit par le champignon *Candida albicans* affecte cette signalisation (Tashiro et al. 2013). Ce composé agit en se liant directement sur le régulateur PqsR. Ceci stimule la liaison de PqsR à la région promotrice de ses gènes cibles dont *pqsA*. La transcription de *pqsA* est réprimée, conduisant ainsi à l'absence de production de PQS. La production des autres facteurs de virulence est également inhibée. Un autre signal, l'indole, qui est utilisé comme molécule signal chez *E. coli* et d'autres bactéries, réprime aussi la signalisation du PQS mais le mécanisme est inconnu (Ryan and Dow 2008, Lee et al. 2009). Des composés bicycliques sont également connus pour inhiber la signalisation du PQS et la production de vésicules membranaires (Tashiro et al. 2010). Ces composés bicycliques, comme l'hydroxyindole et l'isatine sont produits par de nombreuses bactéries comme les espèces *Pseudomonas* et *Burkholderia* (Rui et al. 2005). De manière générale, les dipeptides cycliques peuvent être des inhibiteurs des systèmes de quorum sensing médiés par des AHL.

Ainsi le mécanisme de quorum quenching peut s'avérer être une stratégie efficace de compétition au niveau du sol puisqu'il permet de contrer la synthèse de certains métabolites secondaires et d'interférer avec la communication microbienne.

De multiples facteurs diffusibles affectent donc le métabolisme secondaire des microorganismes et notamment des bactéries. Ces facteurs qu'ils soient constitutifs ou inductibles ont un rôle clé dans les interactions microbiennes au sein des sols.

3.3. Effet de l'environnement physico-chimique sur le métabolisme secondaire des microorganismes

La structure d'une communauté de microorganismes et la régulation du métabolisme secondaire peuvent enfin dépendre de modifications des propriétés physico-chimiques de l'environnement provoquées par les organismes eux-mêmes. L'un des facteurs bien connu pour moduler les interactions microbiennes est le pH. Bien que de nombreux microorganismes (*Streptocoques*, *Lactobacilles* ou *Candida*) puissent occuper des environnements présentant une large gamme de pH, la plupart sont sensibles à des pH inférieurs à 4 (O'May et al. 2005). En plus de cet effet sur la croissance microbienne, le pH environnemental peut aussi influencer d'autres processus microbiens, comme le niveau de production de métabolites secondaires chez des membres de la communauté. Chez *Aspergillus parasiticus*, l'aflatoxine est plus fortement produite dans des conditions acides. À l'inverse, la pénicilline d'*Aspergillus nidulans* voit sa production augmentée en milieu alcalin (Calvo et al. 2002; Peñalva and Arst 2002). Jouer sur le pH peut donc être une stratégie utilisée par les microorganismes afin de moduler la présence de tel ou tel métabolite secondaire dans le sol selon qu'il soit délétère ou bénéfique. Les acides organiques produits par les bactéries, les champignons et plantes peuvent être impliqués dans la régulation de la production de composés antimicrobiens. Chez la bactérie rhizosphérique *P. fluorescens* CHAO, la production d'acide gluconique inhibe complètement la production de pyolutéorine et inhibe partiellement celle du 2,4-diacétylphloroglucinol, deux antifongiques produits par la souche CHAO. Ainsi, l'acide module l'activité de biocontrôle de la bactérie (Werra et al. 2009). L'acide gluconique affecte aussi la biosynthèse des sidérophores pyoverdines chez *Pseudomonas putida* S11, plus particulièrement sa maturation périplasmique et sa sécrétion (Ponraj et al. 2013) et peut donc influencer l'efficacité de colonisation de la rhizosphère (Loper and Henkels 1999). Ainsi, être capable de modifier le pH de son environnement peut être une stratégie efficace sélectionnée par l'évolution afin de favoriser son propre développement et d'inhiber la production de certaines molécules délétères par les autres habitants du sol.

4. Effets des métabolites secondaires sur les communautés microbiennes de l'environnement

4.1. Diversité des métabolites secondaires dans le sol

Les microorganismes, notamment les bactéries, produisent une diversité extraordinaire de métabolites secondaires. On retrouve notamment des pigments tels que les mélanines, les caroténoïdes mais aussi des sidérophores, diverses polycétides ou encore des composés peptidiques. Leurs activités sont tout autant multiples puisqu'ils peuvent avoir des effets antagonistes ou au contraire bénéfiques. Parmi les métabolites secondaires les plus étudiés se trouvent les molécules à activité antibiotique telles que les antibactériens ou les antifongiques. D'un point de vue scientifique, un antibiotique est une substance non protéique (ou un peptide synthétisé en dehors du ribosome) sécrétée par un microorganisme qui est capable à faible concentration soit d'inhiber la croissance soit de tuer d'autres microorganismes n'ayant pas de liens de parenté étroits avec l'organisme producteur. Le genre bactérien qui a contribué en grande partie à leur découverte est de loin le genre *Streptomyces* (Watve et al. 2001; Challis and Hopwood 2003). Au sein des actinomycètes, les membres du genre *Streptomyces* produisent 70 à 80% de composés à activité antibiotique, avec, par rapport à ce qui a été étudié jusqu'à présent, de plus petites contributions des genres tels que *Saccharopolyspora*, *Amycolatopsis*, *Micromonospora*, et *Actinoplanes*. Le nombre d'antibiotiques qui a été découvert à partir de ce groupe a augmenté de manière exponentielle depuis 1960 et est restée au dessus de 100 par année au cours des deux décennies suivantes. La production d'antibiotiques est hautement variable selon les souches de *Streptomyces* (Challis and Hopwood 2003; Davelos et al. 2004; Vetsigian et al. 2011). Ces dernières années, les antibiotiques se sont vus attribués des rôles de signalisation en plus de leur rôle antagoniste. Que les métabolites secondaires soient des molécules avec des activités antagoniste, bénéfique ou de signalisation (Kumbhar et al. 2014), elles permettraient d'apporter un avantage particulier aux producteurs en tant que compétiteur dans un environnement où les ressources nutritionnelles sont limitées.

4.2. Les métabolites secondaires, des molécules antagonistes

4.2.1. Effet antagoniste des antibiotiques

Le sol est très riche en espèces microbiennes, elles peuvent donc localement épuiser les ressources entraînant alors une plus forte compétition. Une des stratégies microbiennes utilisées pour survivre est de produire des composés à activité antibiotique : l'antibiose. Cette dernière qualifie une guerre chimique qui se caractérise par la diffusion de molécules complexes et délétères d'un organisme à un autre. Les antibiotiques sont des molécules organiques d'origine naturelle de faible masse moléculaire (3000 Da), qui ont été isolées en vertu de leur capacité à inhiber ou tuer les organismes vivants. Dans la plupart des cas, ils agissent en se liant à des cibles cellulaires spécifiques. L'un des composés les plus connus est

la pénicilline, antibiotique de la famille des β -lactames, qui a été découvert à partir d'une culture de *Staphylococcus* contaminée et attaquée par le champignon *Penicillium*. L'antibiose regroupe une large variété de mécanismes comme l'inhibition de fonctions cellulaires clés, telles que la respiration cellulaire (cyanure d'hydrogène et acide fusarique), la synthèse de la paroi (pénicilline et acide butyrique), ou les systèmes de transport (phényléthanol), alors que d'autres altèrent l'intégrité des membranes cellulaires (enzymes hydrolytiques, lipopeptides cycliques et polymyxine B, rhamnolipides). Des mécanismes moins classiques existent également tels que l'inhibition de la synthèse des acides gras. Les environnements dans lesquels les molécules à activité antibiotique sont présentes exercent une forte pression de sélection favorisant les microorganismes qui sont soit insensibles ou qui possèdent des mécanismes de résistance à ces composés.

4.2.2. Effet antagoniste des bactériocines

Une autre stratégie utilisée par les microorganismes du sol pour survivre dans un environnement compétitif est la synthèse de composés antimicrobiens appelés bactériocines. Ce sont des substances protéiques mais non essentielles à la survie des producteurs. Contrairement aux antibiotiques, leur spectre d'action est étroit, ces molécules agissent contre des bactéries proches phylogénétiquement du producteur. *Pseudomonas syringae* pv. *Syringae*, *P. aeruginosa*, par exemple, produisent des pyocines (Feil et al. 2005). Elles agissent contre d'autres *Pseudomonas* (Sano et al. 1993). Parmi, les bactéries Gram positives du sol, de la rhizosphère ou encore les bactéries saprophytiques, les bactériocines produites sont surtout des peptides de classe I, que l'on appelle lantibiotiques. Par exemple, la michiganine A est produite par le pathogène de la tomate *C. michiganensis* ssp. *Michiganensis*. Elle inhibe la croissance du pathogène de la pomme de terre *C. michiganensis* ssp. *sepedonicus* (Holtsmark et al. 2008). Ces molécules sont connues pour exercer leur action antimicrobienne en interférant avec l'incorporation des lipides dans le peptidoglycane (Bauer and Dicks 2005). La michiganine A est connue pour inhiber *C. michiganensis* ssp. *sepedonicus* à des concentrations de 10 à 100 nM ce qui est typique des bactériocines de type peptide. Les lantibiotiques sont également produits par les actinomycètes dont *Streptomyces*.

4.2.3. Effet antagoniste des sidérophores

Les sidérophores sont des agents chélateurs de métaux, tels que le fer, et sont donc indispensables à la survie de nombreux microorganismes. Cependant, certaines de ces molécules présentent également des activités antagonistes (Figure 12). En effet, des bactéries productrices de sidérophores, isolées de rhizosphères, telles que *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Azotobacter* présentent des activités antifongiques contre *Sclerotium*, *Fusarium* (Jenifer et al. 2013).



Figure 12 : Photo présentant l'activité antagoniste de sidérophores produits par *Azotobacter* contre le champignon *Fusarium oxysporum* (D'après Muthuselvan and Balagurunathan 2013)

Certains sidérophores ont une très forte affinité pour le fer et présentent une grande stabilité. Ils restreignent donc la croissance des microorganismes qui eux présentent une faible capacité de compétition pour le fer tels que les champignons phytopathogènes. Par exemple, *Azotobacter* spp. produit le sidérophore azotobactine. Ce dernier est libéré lors de très fortes carences en fer (Duhme et al. 1998) Il est très efficace pour capter le fer et interfère même avec l'absorption de la pyoverdine, un sidérophore à forte affinité pour le fer produit par des bactéries telles que *Pseudomonas*. Une étude a révélé la capacité d'*Azotobacter* sp. à contrôler la croissance des agents phytopathogènes *Fusarium* sp. , *Alternaria* sp. , *Phytophthora* sp. , *Rhizoctonia* sp. *Colletotrichum* sp. et *Curvularia* sp. (Muthuselvan and Balagurunathan 2013). L'azotobactine permet donc de contrer la colonisation des racines des plantes par des pathogènes bactériens et fongiques (Schalk 2008).

4.2.4. Effet antagoniste des AHL et de leurs produits de dégradation

Les molécules signal utilisées dans les systèmes de quorum sensing peuvent elles aussi présenter des activités antibiotiques. Kimura et al. ont démontré que les molécules de type 3-oxo-C12-HSL présentent des effets antagonistes contre certaines bactéries (Kimura et al. 2009). Ces molécules suppriment la croissance et la formation de biofilm de *Legionella pneumophila*, bien qu'elles ne présentent pas d'effet bactéricide ou bactériostatique contre d'autres bactéries Gram négatives testées par les auteurs. Cependant, il a été montré que l'acide tétramique, 3-(1-hydroxydécyliène)-5-(2-hydroxyéthyl)pyrrolidine- 2,4-dione, qui est un produit de dégradation des 3-oxo-C12-HSL, présente des activités bactéricides contre toutes les bactéries Gram positives testées, telles que *Bacillus cereus* et *S. aureus*. Il agit en dissipant le potentiel membranaire et la force proton motrice transmembranaire (Kaufmann et al. 2005). L'acide tétramique est spontanément produit à partir des 3-oxo-C12-AHL et est trouvé dans les surnageants de culture de *P. aeruginosa*. Hosono et al. ont montré que cet acide, à une concentration de 100 μ M, a également des activités antimicrobiennes contre

des bactéries Gram négatives telles que *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumonia* ou même *P. aeruginosa* (Honda et al. 2011). Cette concentration peut être biologiquement significative puisque des concentrations supérieures à 600 μM ont été détectées dans les biofilms de *P. aeruginosa* (Tashiro et al. 2013).

4.2.5. Effet antagoniste des molécules volatiles

Enfin, des molécules volatiles peuvent également interférer avec la croissance de certains microorganismes. Le genre *Collimonas* se compose de bactéries qui ont la capacité d'exploiter les hyphes fongiques comme source de nutriments, un phénomène appelé mycophagie. L'analyse de substances volatiles produites par *Collimonas* a révélé qu'elle produisait des composés volatiles à activité antifongique sur différents milieux gélosés. Ces composés ont un effet négatif sur la croissance d'une large gamme d'espèces de champignons (Garbeva et al. 2014) (Figure 13).

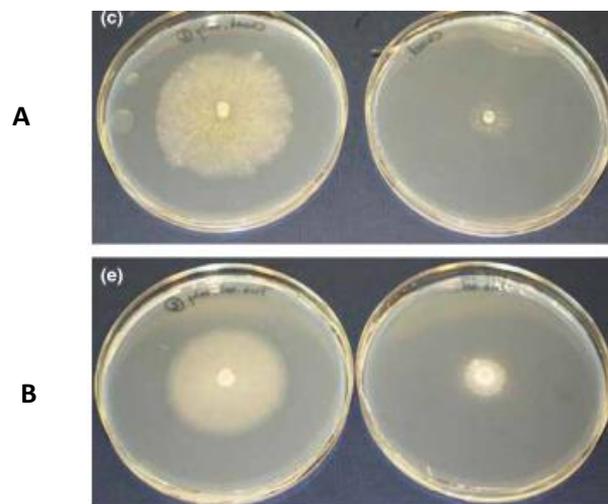


Figure 13 : Effet de composés volatiles produits par *Collimonas pratensis* Ter91 sur la croissance des champignons (**A**) *Chaetomium* sp. et (**B**) *Fusarium solani*. Les boîtes de Pétri à gauche représentent les témoins c'est-à-dire le champignon cultivé en absence de composés volatiles bactériens (D'après Garbeva et al. 2014).

Ces composés volatiles agissent sur une large gamme de champignons du sol, ils sont produits dans des conditions de carence en nutriments, dans des conditions de sol reconstitué, et leur production est renforcée par la présence de champignons ou de dérivés fongiques ou bactériens, le N-acétylglucosamine.

Les molécules volatiles produites sous diverses conditions de croissance se sont également révélées médier les interactions entre des bactéries, des plantes et des nématodes. Elles pourraient influencer la résistance aux antibiotiques, la formation de biofilms et la virulence. Létoffé et al montrent les effets à longue distance de 14 composés volatiles produits par *E. coli* sur elle-même, sur *P. aeruginosa*, *S. aureus* et sur *B. subtilis*. Plusieurs de ces

molécules constituent des signaux chimiques qui influencent positivement ou négativement la croissance, l'adhésion et la motilité des bactéries exposées (Létoffé et al. 2014).

Ainsi, les composés volatiles peuvent affecter le comportement et la structure des communautés microbiennes du sol. Ils contribuent au développement des communautés bactériennes et modulent les phénotypes tels que la tolérance au stress, aux antibiotiques, le morphotype des colonies, le comportement de la communauté ou encore la virulence.

4.3. Les métabolites secondaires, des molécules bénéfiques

De nombreuses interactions microbiennes déterminent les propriétés du sol et sont importantes pour la croissance et les activités des organismes y vivant tels que les microorganismes et les plantes. Dans le cadre de ces interactions, les métabolites secondaires produits peuvent présenter des rôles bénéfiques à la fois envers les partenaires microbiens et même envers les plantes. En effet, les bactéries de type PGPR (Plant Growth-Promoting Rhizobacteria) (Khalid et al. 2004; Jalili et al. 2009), par exemple, améliorent la croissance et le développement des plantes via différents mécanismes dont la synthèse de métabolites secondaires tels que les phytohormones ou la production de sidérophores (Kloepper and Beauchamp 1992; Rana et al. 2012).

4.3.1. Effet bénéfique des sidérophores

4.3.1.1. Chélation du fer par les sidérophores

Les bactéries requièrent des mécanismes d'homéostasie précis pour équilibrer l'apport et le stockage de différents métaux essentiels à la vie. La concentration intracellulaire de chacun de ces métaux est fortement régulée. Les sidérophores sont des métabolites secondaires qui jouent un rôle dans l'homéostasie du fer chez les microorganismes. La concentration en fer libre est toujours très basse dans l'environnement des microorganismes (10^{-7} à 10^{-24} M) (Raymond et al. 2003). La gamme de concentrations des sidérophores dans le sol est assez large puisqu'elle va de 10 μ M à quelques mM (Hersman et al. 1995). Les sidérophores jouent un rôle primordial dans la solubilisation extracellulaire du fer à partir de minéraux afin de le rendre disponible aux microorganismes. Ainsi, la synthèse de ces composés est indispensable à la survie, au bon développement de nombreux microorganismes. L'équipe du Dr Rigali vient de mettre en évidence que les sidérophores de type desferrioxamine ont un rôle primordial dans la différenciation morphologique chez *S. coelicolor* M145 (Lambert et al. 2014). La synthèse de sidérophores peut même favoriser le développement d'autres bactéries. Par exemple, le sidérophore desferrioxamine E produit par *Streptomyces griseus* stimule la croissance et le développement de *Streptomyces tanashiensis*. Des effets similaires sont observés avec la desferrioxamine E produite par d'autres souches d'actinomycètes mais pas avec d'autres sidérophores tels que le ferrichrome ou la nocobactine. L'ajout de desferrioxamine E stimule la formation de métabolites secondaires et/ou la différenciation morphologique chez diverses souches d'actinomycètes (Yamanaka

2005a). De même la desferrioxamine B purifiée stimule la croissance de certaines bactéries isolées de sol. Sur certains isolats, elle stimule la motilité et la synthèse de métabolites secondaires (Eto et al. 2013).

4.3.1.2. Chélation des autres métaux par les sidérophores

Il a également été mis en évidence que ces molécules seraient impliquées dans la chélation d'autres métaux et donc dans leur homéostasie (Schalk et al. 2011; Hussein and Joo 2014). Les desferrioxamines peuvent ainsi former des complexes avec Ga^{3+} , Al^{3+} and In^{3+} , par exemple. La pyoverdine forment des complexes avec Zn^{2+} , Cu^{2+} ou encore Mn^{2+} . Les constantes d'affinité des sidérophores avec ces métaux sont moins fortes qu'avec le fer. Lorsqu'ils sont libres, les métaux toxiques entrent dans le périplasme des bactéries Gram négatives, la plupart du temps par diffusion à travers les porines (Li et al. 1997). La liaison des métaux aux sidérophores dans le milieu extracellulaire réduit donc la concentration en métal libre, affectant probablement la diffusion et donc leur toxicité. Cependant, il est possible que la production de sidérophores en réponse aux métaux lourds puisse avoir des effets délétères. Si le récepteur de sidérophore ne distingue pas la différence entre le complexe fer-sidérophore et le complexe métal toxique-sidérophore, les sidérophores peuvent devenir un mécanisme secondaire d'import de métaux toxiques. C'est pourquoi, les voies d'internalisation des ferrisidérophores doivent présenter des spécificités aux métaux lourds à transporter et ainsi importer uniquement les métaux appropriés.

4.3.2. Effets bénéfiques des phytohormones

Les bactéries PGPR produisent des phytohormones (Perrig et al. 2007; Naz et al. 2009) telles que l'acide indole 3-acétique aussi appelé auxine, les cytokinines, l'acide gibbérellique, l'éthylène ou encore l'acide abscissique. Elles produisent également des facteurs régulant la croissance des plantes tels que les polyamines (Thuler et al. 2003) dont fait partie la cadavérine, composé qui stimule la croissance racinaire (Niemi and Häggman 2002) et la réponse au stress osmotique chez les plantes. La production de phytohormones altère le métabolisme des plantes et leur morphologie en améliorant leur absorption en eau et en minéraux. L'activité biologique des phytohormones peut influencer grandement les processus tels que la germination, la croissance précoce des semis ou encore la colonisation bactérienne des plantes. Les phytohormones produites par certaines bactéries du sol peuvent influencer, par exemple, sur l'établissement des symbioses endomycorhiziennes à arbuscules ainsi que sur la germination des spores et la croissance des hyphes des champignons (Barea et al. 2005).

4.3.3. Effets bénéfiques des composés volatiles

Certaines rhizobactéries PGPR stimulent la croissance des plantes et déclenchent la résistance systémique induite via des composés organiques volatiles (Farag et al. 2013). Une large gamme de produits volatiles sont synthétisés, tels que les aldéhydes aliphatiques à chaîne courte, les esters, les alcools, des éthers, etc. Ces composés confèrent également la tolérance systémique induite aux stress abiotiques tels que la résistance à la sécheresse et aux métaux lourds. Les composés volatiles produits par *B. subtilis* GB03 déclenchent la redistribution d'auxine dans la plante entière aboutissant ainsi à l'expansion cellulaire des feuilles, la ramification des racines, l'augmentation de l'absorption du fer et une augmentation de la photosynthèse, ce qui déclenche la promotion de la croissance (Zhang et al. 2007). *Medicago truncatula* est une plante modèle utilisée pour comprendre les interactions bactéries-légumineuses. Les racines de *M. truncatula* forment une symbiose racinaire avec formation de nodules en présence de la bactérie *Sinorhizobium meliloti* qui est une bactérie fixatrice d'azote. *M. truncatula* perçoit son symbiote à travers l'émission de composés volatiles, et en réponse, augmente les mécanismes d'absorption du fer, facilitant la symbiose (Orozco-Mosqueda et al. 2013).

4.4. Les métabolites secondaires, des molécules de signalisation

Un nombre croissant d'études ont utilisé les technologies de puces à ADN et les bibliothèques de fusions transcriptionnelles afin d'analyser l'effet de concentrations subinhibitrices d'antibiotiques sur la physiologie de microbes cibles. À des concentrations subinhibitrices, les antibiotiques modulent la transcription de 5 à 10 % des promoteurs de gènes bactériens dans la cellule, induisant souvent des inductions ou des répressions d'un facteur allant de 10 à 100, avec des effets très limités sur la croissance (Goh et al. 2002; Lin et al. 2005; Linares et al. 2006) (Figure 14).

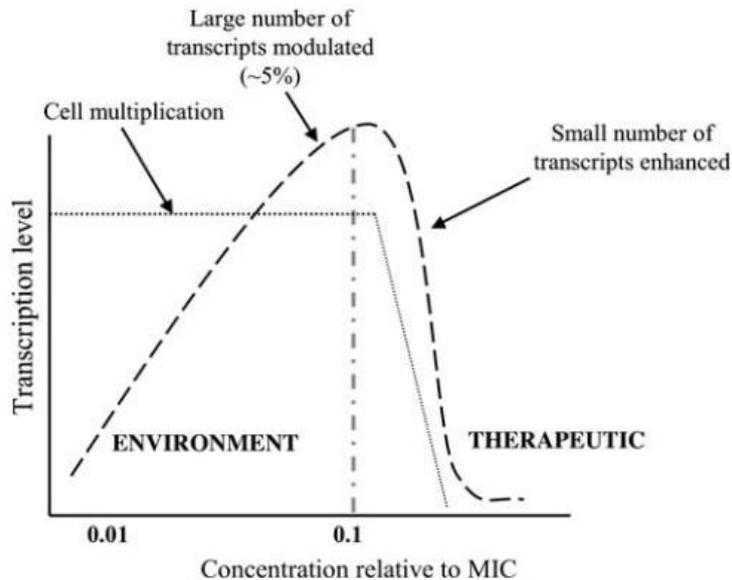


Figure 14 : Diagramme montrant la relation entre la concentration en petites molécules (antibiotiques), la modulation transcriptionnelle et l'inhibition de la croissance. Le MIC fait référence à Concentration Minimale Inhibitrice (D'après Davies 2006).

Des concentrations d'antibiotiques subinhibitrices peuvent augmenter l'expression de gènes codant des déterminants bactériens qui influencent l'interaction avec les cellules hôtes (Hoffman et al. 2005; Linares et al. 2006; Babić et al. 2010). Ces études ont démontré des changements dans l'expression de gènes impliqués dans des processus biologiques essentiels, tels que la transcription, la traduction, la production d'exopolysaccharides, la virulence, le quorum sensing et la formation de biofilm. De nombreuses molécules ont un effet pléiotrope, c'est à dire qu'elles affectent plusieurs processus biologiques simultanément, ou même induisent des réponses variables selon les espèces bactériennes. Par conséquent, certains antibiotiques ont probablement des cibles multiples et, en fonction de la concentration utilisée, peuvent se lier de préférence à l'une ou l'autre. Les réponses des bactéries aux antibiotiques est donc de type hormétique, à faible concentration, il y a modulation du métabolisme primaire et secondaire, en revanche à forte concentration, l'effet est bactériostatique voir bactéricide.

Par exemple, chez *P. aeruginosa*, bien que les molécules signal AHL et PQS soient synthétisées pendant la phase exponentielle tardive de croissance, la pyocyanine, une phénazine, est sécrétée pendant la phase stationnaire. Cette dernière régule à la hausse l'expression de gènes connus pour être contrôlés par un mécanisme de quorum sensing (Dietrich et al. 2006). En outre, les phénazines contrôlent également la morphologie des colonies non seulement chez *P. aeruginosa* mais également chez les bactéries Gram positives telles que *S. coelicolor* (Dietrich et al. 2008). Cet effet est médié par un régulateur transcriptionnel, SoxR, chez les deux bactéries. Ainsi, les phénazines peuvent agir en tant

que molécule de signalisation intercellulaire et peuvent permettre le dialogue entre les différents organismes (Tashiro et al. 2013).

Certains composés volatiles organiques fonctionnent comme des molécules signal, cependant leur identité et leur effet sur l'expression globale des gènes et les processus physiologiques sont encore mal connus. Les composés volatiles 2,3-butanedione et l'acide glyoxylique issus de *B. subtilis* provoquent des changements globaux dans l'expression de gènes liés à la motilité et à la résistance d'antibiotiques chez *E. coli*. Les bactéries utilisent ces molécules afin de sentir les autres bactéries et pour réguler l'expression de gènes impliqués dans l'adaptation à leur environnement (Kim et al. 2013). Ces composés sont des signaux chimiques de communication intra et interspécifiques (Effmert et al. 2012).

Cette partie illustre bien l'importance des métabolites secondaires dans le développement et la structuration des communautés microbiennes du sol, de la rhizosphère et même de la mycorrhizosphère. Ils ont également un impact sur les plantes. Ainsi, cet ensemble de molécules, de signaux, serait un facteur central du fonctionnement de l'écosystème sol.

5. *Streptomyces* et *Pseudomonas*

L'analyse du génome de nombreuses bactéries a révélé que leur potentiel biosynthétique était jusqu'à présent encore largement sous-estimé. La synthèse de certains métabolites en conditions de laboratoire est faible ou non induite. C'est pourquoi ces dernières années, diverses stratégies ont été développées afin de déclencher ou stimuler leur production. L'une de ces stratégies consiste à replacer les microorganismes dans un contexte environnemental, c'est-à-dire en interactions avec leurs partenaires. Ceci permet par la même occasion d'avoir un premier regard sur les interactions microbiennes dans l'environnement et de commencer à décrypter les fonctions écologiques des métabolites secondaires produits. Comme expliqué précédemment, dans un premier temps, les interactions ont souvent été réalisées sur milieu synthétique selon un schéma simplifié, deux partenaires. Elles permettent de cette manière de mimer partiellement les interactions microbiennes qui se mettent en place dans l'environnement et ainsi d'avoir accès aux échanges de signaux qui interviennent entre les partenaires.

Afin d'analyser les interactions entre les bactéries du sol et notamment la place des métabolites secondaires au sein de ces interactions, la bactérie modèle du laboratoire (Dynamique des Génomes et Adaptation Microbienne UMR 1128), *Streptomyces ambofaciens* ATCC 23877 a été utilisée. Au cours de la thèse, une autre bactérie du sol s'est révélée être impliquée dans différentes interactions avec *S. ambofaciens* ATCC 23877. Il s'agit de la bactérie modèle du laboratoire IAM (Interactions Arbres/Microorganismes UMR 1126), *Pseudomonas fluorescens* BBc6R8.

5.1. Importance des *Streptomyces* et *Pseudomonas* dans le sol

Les *Streptomyces* et *Pseudomonas* font partie des bactéries identifiées dans les communautés microbiennes des sols. Elles occupent différentes niches mais sont particulièrement abondantes dans la rhizosphère (Uroz et al. 2010; Schrey et al. 2012). Les *Streptomyces* sont des bactéries filamenteuses appartenant à l'ordre des Actinomycétales. Les *Pseudomonas* appartiennent à l'ordre des Pseudomonales. Elles sont connues pour jouer divers rôles dans le sol et impactent la structure des communautés microbiennes ainsi que le développement des plantes et arbres.

Elles sont essentielles aux cycles biogéochimiques grâce à leur capacité à produire une vaste gamme d'enzymes hydrolytiques extracellulaires (chitinases, cellulases,...), elles peuvent dégrader des polymères organiques insolubles provenant de champignons, de plantes ou d'animaux. La forte capacité des *Streptomyces* à métaboliser diverses sources de carbone et d'azote augmente leur potentiel à concurrencer efficacement d'autres organismes pour les ressources au sein de la rhizosphère (Schlatter et al. 2009).

Les *Streptomyces* peuvent moduler la défense des plantes face à des phytopathogènes en stimulant les mécanismes de défense locaux ou systémiques ou au contraire faciliter la colonisation des racines de plantes (Schrey and Tarkka 2008). La production d'oxide par les *Streptomyces* permettrait d'activer les défenses de plantes ce qui serait un moyen supplémentaire pour protéger les plantes des organismes pathogènes (Kinkel et al. 2012). Elles stimulent l'établissement de la symbiose entre les arbres et les champignons (Schrey et al. 2005).

Les *Pseudomonas* montrent diverses activités dans les sols. Un faible nombre d'espèces sont reconnues comme des pathogènes de plantes, parmi celles-ci une des plus connues est *P. aeruginosa*. D'autres sont connues pour promouvoir naturellement la santé des plantes en contrôlant de nombreux pathogènes de plantes (Peix et al. 2009) via la compétition pour le fer ou en inhibant directement les pathogènes via la synthèse de métabolites à activité antimicrobienne (phenazine ou antibiotique de type polycétide tel que le 2,4DAPG). Et enfin d'autres espèces sont des bactéries auxiliaires de mycorhization (Garbaye 1994; Frey-Klett et al. 2007).

La diversité des métabolites secondaires produits par *Streptomyces* offre un énorme potentiel pour inhiber la croissance ou même tuer d'autres organismes tels que des champignons, des bactéries ou même des nématodes. Elles sont donc connus pour leur capacité à être des agents de biocontrôle (Samac and Kinkel 2001; Samac et al. 2003). En fait, 5 à 10% du génome des *Streptomyces* est dédié à la production de métabolites secondaires. La diversité des métabolites secondaires produits parmi les *Streptomyces* est en partie due à la structure de leur génome, avec une abondance d'éléments transposables

près des extrémités de leur chromosome linéaire ce qui permettrait l'échange de gènes « accessoires » (Chen et al. 2002).

5.2. Cycle de développement et production de métabolites secondaires chez *Streptomyces*

La synthèse des métabolites secondaires produits par les *Streptomyces* est régulée en fonction de leur cycle de développement. Les *Streptomyces* se développent selon un cycle complexe (Champness, 2000, Chater, 1993) (Figure 15) qui débute par la germination d'une spore donnant ainsi naissance à un filament appelé hyphe. Celui-ci se développe de manière radiale par croissance apicale conduisant à la formation d'un réseau ramifié, le mycélium végétatif. Un ensemble de stimuli, notamment une limitation en nutriments, induit alors un processus de différenciation morphologique conduisant à la formation d'un mycélium aérien composé d'hyphes non ramifiées. La différenciation tardive des hyphes aériens s'achève par la septation synchrone des filaments aériens aboutissant ainsi à la formation de spores. La différenciation morphologique est accompagnée d'une différenciation biochimique drastique, qui correspond au passage du métabolisme primaire au métabolisme secondaire avec notamment la production d'antibiotiques.

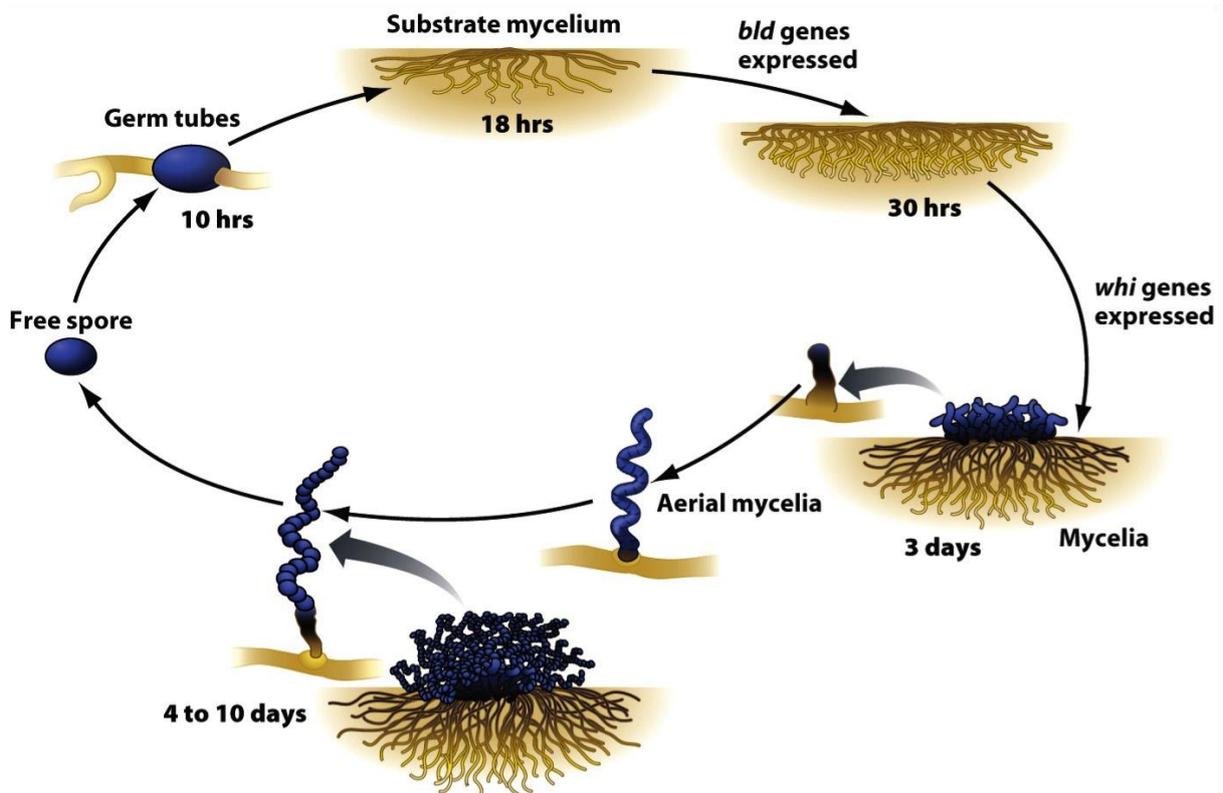


Figure 4.29 Microbiology: An Evolving Science
© 2009 W. W. Norton & Company, Inc.

Figure 15 : Cycle de développement de *Streptomyces*

5.3. Modèles d'étude

5.3.1. *S. ambofaciens* ATCC 23877

S. ambofaciens ATCC 23877 est l'une des bactéries modèles étudiées au laboratoire DynAMic (UMR 1128) (Figure 16).

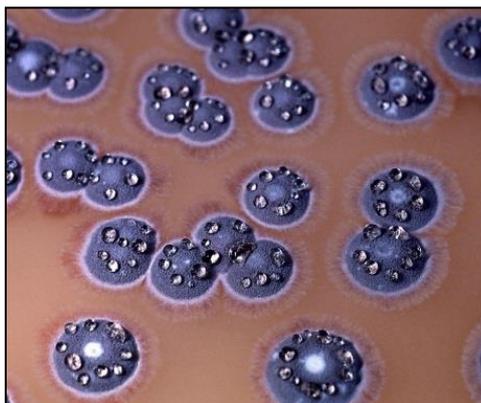


Figure 16: Photo de *S. ambofaciens* (mml.sjtu.edu.cn)

Cette espèce, isolée d'un sol en Picardie en 1954, présente un intérêt industriel. Elle est notamment exploitée pour la production de la spiramycine, un macrolide utilisé en thérapie humaine comme antibactérien et contre la toxoplasmose. *S. ambofaciens* produit également la congocidine, une pyrrolamide présentant des propriétés antitumorales mais non utilisée en thérapie à cause d'une cytotoxicité trop importante. L'analyse de la séquence de son génome a révélé l'existence de 23 autres clusters de gènes potentiellement impliqués dans la synthèse de métabolites secondaires (Figure 17). L'étude de ces clusters a permis de caractériser de nouveaux composés ainsi que des composés connus mais encore jamais caractérisés jusqu'à présent. Parmi les clusters, on retrouve ceux impliqués dans la synthèse de la kinamycine, de la stambomycine, des sidérophores (desferrioxamines et coelichéline), des terpénoïdes volatiles [géosmine (un seul gène), 2-méthylisobornéol (MIB), albaflavénone] ou encore des caroténoïdes (Barona-Gómez et al. 2004; Lautru et al. 2005; Bunet et al. 2008; Laureti et al. 2011; Aigle et al. 2014). Cette analyse a également permis de découvrir le cluster impliqué dans la synthèse de la congocidine (Juguet et al. 2009) et de caractériser pleinement le cluster spiramycine (Karray et al. 2007). L'analyse de la séquence de l'ARN 16S révèle que *S. ambofaciens* ATCC 23877 est très proche de *S. coelicolor* A3(2) (seulement 1.1 % de divergence). Une comparaison des génomes révèle un fort taux de synténie entre les deux espèces, excepté pour deux événements d'inversion centrés sur l'origine de réplication. Néanmoins, plus de la moitié des 25 clusters de métabolites secondaires identifiés chez *S. ambofaciens* ATCC 23877 ne sont pas conservés chez *S. coelicolor* A3(2) et réciproquement. Parmi les produits naturels synthétisés l'arsenal des antibiotiques est majoritairement spécifique à chaque espèce.

L'un des avantages que présente *Streptomyces ambofaciens* ATCC 23877 concerne sa facilité à être cultivée en conditions de laboratoire ainsi que la connaissance des protocoles de transformation. Ceci facilite grandement son utilisation *in vitro*.

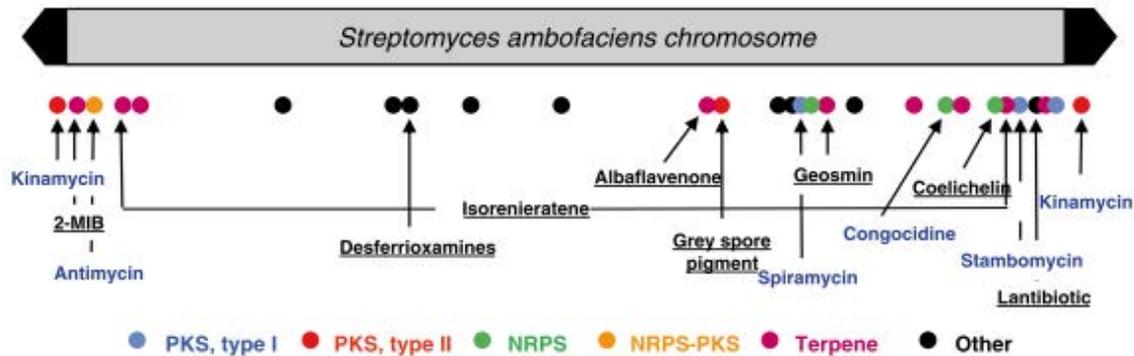


Figure 17 : Représentation schématique du chromosome linéaire de *S. ambofaciens* ATCC 23877 et localisation des clusters de gènes de métabolites secondaires identifiés. Les clusters sont indiqués par des cercles pleins. Les couleurs correspondent aux différentes catégories de clusters. Les métabolites communs à *S. ambofaciens* et *S. coelicolor* sont soulignés. Les métabolites spécifiques à *S. ambofaciens* sont en bleu. Les flèches noires à l'extrémité du chromosome représentent les répétitions inversées terminales (TIRs) (Aigle et al. 2014).

5.3.2. *P. fluorescens* BBc6R8

Dans le cadre de la thèse, la bactérie *P. fluorescens* BBc6R8 a été utilisée (Figure 18). Cette bactérie Gram négative, modèle du laboratoire Interactions Arbres/Microorganismes, est une bactérie auxiliaire de mycorhization isolée des corps de fructification du champignon *L. bicolor* S238N.



Figure 18: Photo de *P. fluorescens* (à gauche) et photo du champignon *L. bicolor* S238N (à droite)

Elle promeut la survie présymbiotique et la croissance de ce champignon ectomycorhizien (Frey et al. 1997; Brulé et al. 2001; Frey-Klett et al. 2005; Deveau et al. 2010). Elle contribue aux cycles biogéochimiques, à la nutrition des arbres via son effet sur la symbiose ectomycorhizienne et à la protection des racines contre des champignons phytopathogènes.

P. fluorescens BBc6R8 produit notamment deux sidérophores, la pyoverdine et l'énantio-pyochéline. Elle sécrète également la vitamine B1 (thiamine) qui permet de promouvoir la croissance du champignon *L. bicolor* S238N. Sa séquence génomique est approximativement de 7 Mb avec un pourcentage en bases GC de 61 % et 6317 gènes prédits. Son génome montre un faible niveau de synténie et d'orthologie avec ceux des autres souches de *P. fluorescens* du même sous groupe (Deveau et al. 2014b).

6. Objectifs de la thèse

Dans le cadre de ma thèse, je me suis intéressée aux interactions entre bactéries issues de sols, bactéries qui pourraient partager des niches écologiques communes. Et plus particulièrement aux interactions impliquant le genre *Streptomyces*. Les *Streptomyces* sont des bactéries ubiquistes. Elles représentent environ 10% de la flore microbienne des sols (Janssen 2006). Au niveau de la rhizosphère, de la mycorrhizosphère ou de la minéralosphère, les bactéries du genre *Streptomyces* seraient capables d'interagir physiquement et métaboliquement, au travers de leur métabolisme secondaire très diversifié, avec d'autres microorganismes. Cependant, très peu de données existent sur ces interactions. Quels sont les facteurs biotiques influençant le métabolisme secondaire de ces bactéries ? Quels sont les signaux de l'environnement qui contrôlent l'expression des gènes de biosynthèse des métabolites secondaires ? La croissance des bactéries productrices d'antibiotiques comme les *Streptomyces*, serait localisée dans des niches plutôt que distribuée de manière homogène dans le sol. C'est pourquoi, on s'attend à ce que la production et la présence des antibiotiques soient limitées aux quelques microhabitats où les conditions sont favorables à la croissance de ces souches. Si tel est le cas, cela peut compliquer la détection des antibiotiques ainsi que l'étude de leurs fonctions écologiques. Ainsi, pour aller plus loin dans la compréhension et l'analyse du métabolisme secondaire des *Streptomyces*, il devient indispensable d'appréhender le rôle biologique des métabolites secondaires et donc de répondre aux questions suivantes : Quelle est la diversité des rôles des métabolites secondaires dans le contexte écologique ? Quels sont leurs effets sur les communautés microbiennes du sol ? Ainsi, nous faisons les hypothèses que l'expression du métabolisme secondaire des *Streptomyces* est influencée par l'environnement biotique de ces bactéries, et qu'en retour ce métabolisme conditionne les relations qu'elles établissent avec d'autres microorganismes au sein des communautés microbiennes du sol. L'objectif du projet de thèse est donc de tester la validité de ces hypothèses.

Comme expliqué au cours de l'introduction, la première étape à réaliser pour débiter l'étude des interactions microbiennes dans l'environnement est la réalisation de co-cultures entre les partenaires microbiens sur milieu synthétique en boîtes de Petri. La stratégie initiale était de mettre une bactérie productrice de métabolites secondaires, la bactérie modèle *S. ambifaciens* ATCC 23877, en présence d'autres bactéries du sol telles que *P. fluorescens* BBc6R8, *Burkholderia glathei* PML1(12) ou *Collimonas* PMB1(3). L'objectif de ces

expériences était de révéler certains comportements d'antibiose, de stimulation de croissance d'un organisme sur l'autre ainsi que des phénomènes d'inhibition ou de stimulation de synthèse de métabolites secondaires. Par la suite, le décryptage des mécanismes moléculaires mis en jeu dans ces interactions a été réalisé.

Ce travail permet de mimer à petite échelle les interactions qui peuvent se produire au sein du sol forestier et d'avoir une première idée des dialogues moléculaires mis en jeu entre les partenaires microbiens. À moyen terme, il s'agira de se servir des résultats obtenus *in vitro* pour les replacer dans un système type microcosme c'est-à-dire replacer les bactéries en contact avec les champignons naturellement associés par exemple ainsi que les plantes. Enfin, à plus long terme, l'objectif sera d'étudier ces interactions dans des milieux de complexité croissante qui vont mimer le sol forestier puis dans l'écosystème naturel c'est-à-dire en sol forestier et de révéler l'impact des métabolites secondaires produits sur la structuration des communautés microbiennes du sol et sur leurs interactions.

Ainsi le travail effectué dans le cadre de cette thèse est un premier pas sur le chemin de la compréhension des dialogues moléculaires, impliquant des métabolites secondaires, entre organismes vivants au sein du sol forestier.

-Chapitre 2-

Résultats

Résultats

1. Stratégie de travail

L'objectif général de la thèse est d'étudier les dialogues qui s'établissent entre les microorganismes du sol et plus particulièrement l'implication des métabolites secondaires au sein de ces interactions. Comme expliqué dans l'introduction, au départ de ce travail, la souche bactérienne *S. ambofaciens* ATCC 23877 a été choisie comme modèle d'étude. Elle est connue pour produire de nombreux métabolites secondaires. L'objectif était donc de déterminer l'influence d'autres bactéries du sol sur la synthèse de ces métabolites mais également l'influence de ces molécules sur les partenaires bactériens. La stratégie d'analyse globale a donc consisté à réaliser du criblage, déclinée en deux approches expérimentales.

1.1. Approches

1.1.1. Criblage d'interactions : réalisation de cocultures entre *S. ambofaciens* ATCC 23877 et d'autres bactéries du sol

D'une part, il s'agissait d'analyser les interactions potentielles entre *S. ambofaciens* et différents microorganismes isolés d'un sol forestier. Ceci a été réalisé par des cocultures sous forme de stries entre *S. ambofaciens* ATCC 23877 et d'autres bactéries du sol sur différents milieux gélosés. Ces expériences avaient pour but de révéler certains comportements d'antibiose, de stimulation de croissance ou tout phénotype visible d'un organisme sur l'autre.

Ces résultats ont permis une présélection des couples de microorganismes. Deux stratégies ont été testées en parallèle. La première devait permettre de détecter d'éventuelles conditions d'induction de la synthèse d'antibiotique chez *S. ambofaciens*. La seconde devait permettre, quant à elle, de détecter d'éventuelles conditions d'inhibition de cette synthèse. Dans le premier cas, des cocultures ont été réalisées sur un milieu où *S. ambofaciens* n'est pas censée produire d'antibiotique. Par exemple, l'antibiotique kinamycine n'est pas censé être produit sur le milieu MP5. Dans le second, elles ont été réalisées sur un milieu de culture que l'on sait être favorable à la synthèse d'un antibiotique par *S. ambofaciens*. Par exemple, l'antibiotique kinamycine est connu pour être produit sur le milieu R2. Un criblage avec des souches bactériennes sensibles aux antibiotiques produits par *Streptomyces* a permis de révéler ces phénomènes d'induction ou d'inhibition. En ce qui concerne les partenaires de *S. ambofaciens* ATCC 23877, plusieurs souches isolées du sol ont été étudiées: *P. fluorescens* BBc6R8, *Burkholderia glathei* PML1(12) et *Collimonas* sp. PMB3(1). *P. fluorescens* BBc6R8 est une bactérie modèle de l'unité Interaction Arbres-Microorganismes. C'est une bactérie auxiliaire de la mycorhization qui stimule la symbiose entre le champignon *L. bicolor* et le pin Douglas (Frey-Klett et al. 1997; Deveau et al. 2010). *Burkholderia glathei* PML1(12) a été isolée de la mycorhizosphère, issue du champignon

Scleroderma citrinum en association avec le chêne *Quercus petraea*, et *Collimonas* sp. PMB3(1) a été isolée du manteau fongique provenant de cette symbiose. Ces deux dernières souches interviennent dans le recyclage des minéraux du sol (Uroz et al. 2007). Les milieux sélectionnés ont été le milieu R2, milieu de production de la kinamycine (Pang et al. 2004) et de la stambomycine (Laureti et al. 2011) et le milieu MP5, milieu de production de la congocidine et la spiramycine. Par la suite d'autres milieux chimiquement définis issus de la littérature ont été utilisés tels que les milieux AGS (Arginine-glycerol salt) (Herron and Wellington 1990), 24 ou 25 (Suutari et al. 2002). Dans l'étude de Suutari, le milieu 26 contient de la farine de soja, j'ai donc décidé de le remplacer soit par du glucose soit par de l'amidon, ce qui a donné, respectivement, les milieux 26A et 26B. Ces différents milieux ont été sélectionnés car ils permettent l'isolation et la croissance de plusieurs souches environnementales de *Streptomyces*. La production des différents antibiotiques connus chez *S. ambofaciens* ATCC 23877 n'avait encore jamais été analysée sur ces milieux. Ainsi, il était possible que la bactérie ne produise aucun de ses métabolites secondaires, quelques-uns, tous ou même que la croissance de la bactérie sur ces milieux stimule la production de nouvelles molécules encore jamais détectées auparavant en conditions de laboratoires. L'enjeu a donc été double puisque pour chaque milieu testé avec une souche indicatrice en particulier nous avons découvert le phénotype d'activité de *S. ambofaciens* ATCC 23877 pour la première fois et en parallèle nous avons analysé l'impact des différentes bactéries du sol sur ces phénotypes.

1.1.2. Criblage à moyen débit de microorganismes capables d'influencer le métabolisme secondaire de *S. ambofaciens*

En parallèle du criblage par cocultures, un test de criblage à moyen débit des microorganismes capables d'influencer le métabolisme secondaire de *S. ambofaciens* a été développé. Des cocultures entre des souches biosenseurs et différents partenaires microbiens devaient permettre d'identifier les microorganismes capables d'influencer les voies du métabolisme secondaire de *S. ambofaciens*. Pour ce faire, plusieurs souches biosenseurs de *Streptomyces* ont été construites. Dans chacune d'entre elles, un gène rapporteur a été introduit, par l'intermédiaire d'un plasmide conjugatif intégratif, dans le chromosome de *S. ambofaciens* en aval d'un promoteur d'un gène codant un régulateur spécifique ou un gène de biosynthèse, essentiel des voies de biosynthèse de métabolites secondaires d'intérêt. Les gènes rapporteurs sélectionnés ont été des gènes codant des protéines fluorescentes (type eGFP (Enhanced Green Fluorescent Protein) et RFP (Red Fluorescent Protein)) et une protéine luminescente (type Luciférase). Les voies métaboliques analysées ont été les voies de biosynthèse connues c'est-à-dire celles de la kinamycine, spiramycine, congocidine et stambomycine.

1.2. Mise en évidence de trois interactions entre *Streptomyces* et *P. fluorescens* BBc6R8

Parmi l'ensemble des cocultures réalisées entre *S. ambofaciens* ATCC 23877 et d'autres bactéries du sol sur les différents milieux gélosés, deux ont mis en évidence un effet de l'interaction entre les partenaires microbiens sur la synthèse de métabolites secondaires. Chacune de ces interactions a été découverte grâce à l'apparition sur les boîtes de cultures d'un phénotype visuel particulier. En effet, de nombreux métabolites secondaires (ou leurs produits de dégradation) sont pigmentés donc l'apparition ou la disparition d'une couleur lors des cocultures permet de suggérer un effet de l'interaction sur la synthèse d'un ou de plusieurs métabolites secondaires.

Ces deux interactions impliquent les partenaires microbiens *S. ambofaciens* ATCC 23877 et *P. fluorescens* BBc6R8. L'une d'entre elles se déroule sur le milieu 26A, milieu limité en fer, qui favorise la production de sidérophores, l'autre se déroule sur le milieu R2, milieu qui favorise notamment la production de l'antibiotique kinamycine. Une troisième interaction a été mise en évidence, elle implique *S. coelicolor* A3(2) et *P. fluorescens* BBc6R8. *S. coelicolor* A3(2) est une autre bactérie modèle du sol, productrice de métabolites secondaires. L'interaction entre *S. coelicolor* A3(2) et *P. fluorescens* BBc6R8 se déroule également sur milieu R2, le métabolite secondaire impliqué est la γ -actinorhodine.

Dans la suite de cette partie seront présentés les travaux réalisés et résultats obtenus pour chacune de ces interactions.

2. Piratage de sidérophores entre *S. ambofaciens* ATCC 23877 et *Pseudomonas* BBc6R8

Je vais, dans un premier temps, présenter l'interaction mise en évidence sur le milieu 26A. L'ensemble des résultats obtenus au cours de l'analyse de cette interaction est décrit dans l'article « *Pseudomonas fluorescens* pirates both ferrioxamine and ferri-coelichelin siderophores from *Streptomyces ambofaciens* » (Galet et al. 2015) publié dans le journal Applied and Environmental Microbiology (AEM). Ces résultats seront donc présentés sous forme de résumé.

2.1. Introduction

2.1.1. Importance du fer pour les organismes vivants

Pour tous les organismes, le fer est un élément essentiel à la vie. Il intervient en effet dans de nombreuses fonctions métaboliques et de signalisation. Le fer peut adopter deux formes ioniques différentes Fe^{2+} ou Fe^{3+} . Cette flexibilité fait du fer un acteur important des réactions d'oxydo-réduction de la cellule. Ainsi, il va servir de centre catalytique d'enzymes

intervenant dans ce type de réactions. Cependant, bien que le fer soit un élément abondant sur terre, le 4^{ème} élément le plus abondant dans la croûte terrestre, sa biodisponibilité est réduite dans les milieux aérobies. En effet, en présence d'oxygène, l'ion ferrique (Fe^{3+}) va former des hydroxydes ferriques insolubles ($\sim 10^{-24}$ M) (Barry and Challis 2009; Hider and Kong 2010; Chu et al. 2010). De ce fait, il devient un facteur limitant pour le développement des microorganismes. De nombreuses bactéries requièrent une concentration minimum de 10^{-6} M de fer alors qu'elle est estimée à 10^{-9} M dans le sol forestier (Llamas et al. 2006). Les concentrations environnementales en fer sont donc trop basses pour que les microorganismes puissent survivre en utilisant seulement le fer libre. Le fer ferreux, Fe^{2+} a une meilleure solubilité mais il n'est présent que sous des conditions anoxiques ou à très faible pH. Pour s'affranchir de cette limite, les bactéries aérobies ont donc développé différentes stratégies afin d'acquérir cet élément, telles que la réduction d'ions ferriques en ions ferreux, l'acquisition du fer à partir des protéines de liaison au fer ou de l'hème de l'hôte colonisé, ou la chélation par des sidérophores ou des hèmes. Les sidérophores sont des systèmes spécialisés de haute affinité permettant aux organismes de puiser au sein de l'environnement le fer sous forme d'ions Fe^{3+} et de le transporter dans les cellules où il est généralement complexé avec des protéines de stockage et de transport, telles que les bactérioferritines ou réduit sous sa forme ferreuse.

2.1.2. Les sidérophores chez *Pseudomonas fluorescens*

Les souches de *P. fluorescens* se distinguent des autres *Pseudomonas* par le pigment vert-jaune qu'elles produisent (Stanier et al. 1966). Il s'agit d'un sidérophore de haute affinité de type catécholates-hydroxamate, la pyoverdine, molécule sécrétée en réponse à une limitation en fer. Aujourd'hui, près de 50 structures complètes ou presque complètes de pyoverdine ont été élucidées. Différentes pyoverdines peuvent être produites par un organisme, chacune d'entre elles ayant une chaîne peptidique différente et généralement un chromophore conservé conférant la couleur typique et la fluorescence sous les UV (Ravel and Cornelis 2003; Visca et al. 2007) (Figure 19).

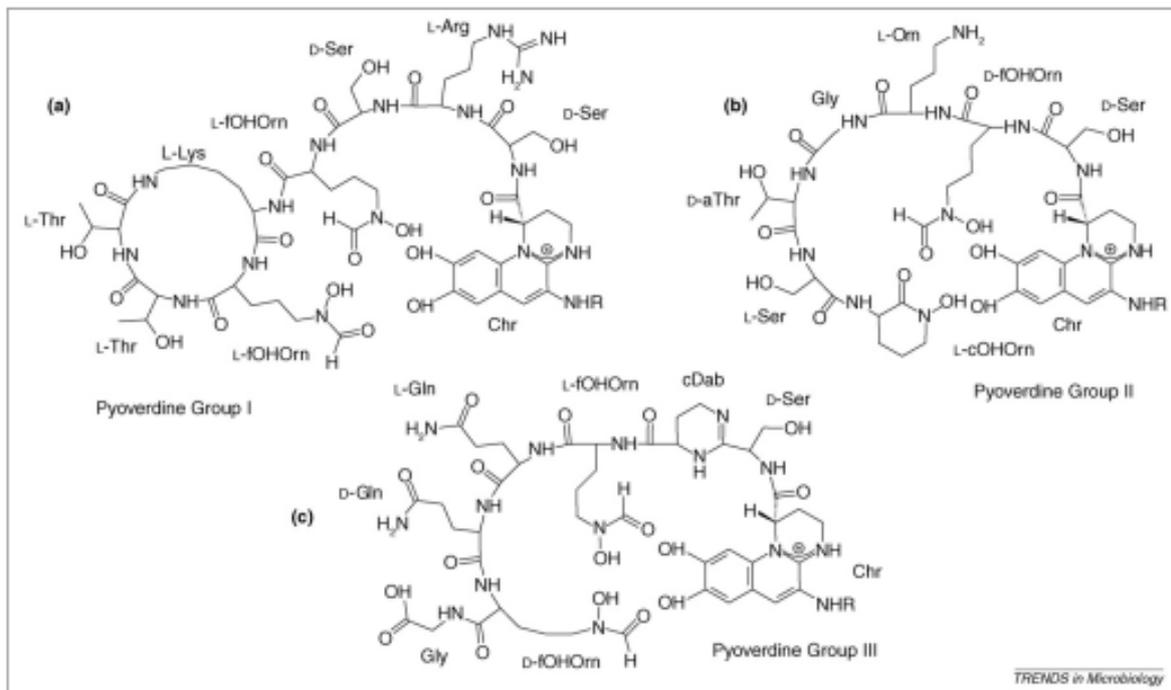


Figure 19 : Représentation des trois types de pyoverdines produites par les différentes souches de *P. aeruginosa*. Ces pyoverdines varient au niveau de leur peptide. Le chromophore est toujours identique. Le groupement « R » représente la chaîne acyle latérale variable dans les différents isoformes : il s'agit d'un acide dicarboxylique ou d'un amide. Chacun des six atomes d'oxygène situés autour de l'hexagone interviennent dans la chélation du fer (Visca et al. 2007).

La plupart des *Pseudomonas* fluorescents produisent, en plus de la pyoverdine, d'autres sidérophores de plus faible affinité comme par exemple la pyochéline, pseudomonine, corrugatine ou encore la thioquinolobactine (Cornelis and Matthijs 2002; Matthijs et al. 2009). Ces sidérophores peuvent être de différentes natures, certains sont des dérivés peptidiques (synthétisés par des NRPS) comme la pyochéline ou l'énantio-pyochéline de *P. fluorescens* BBc6R8. Certaines bactéries produisent de multiples sidérophores qui ne sont pas forcément tous produits ensemble au même moment (Dumas et al. 2013).

2.1.3. Les sidérophores chez *S. ambofaciens* ATCC 23877 et *S. coelicolor* A3(2)

La production et l'import de sidérophores et donc l'acquisition du fer sont des facteurs clés pour déclencher la croissance et la morphogénèse chez *Streptomyces*. Par exemple, l'équipe de S. Rigali a démontré que les mutants bald de *S. coelicolor*, ceux bloqués au stade végétatif incapables de former du mycélium aérien, seraient notamment affectés dans la production des sidérophores desferrioxamines et/ou l'import de ferrioxamine (Lambert et al. 2014). D'autre part, des sidérophores, tels que la desferrioxamine E, sont connus, pour stimuler la croissance, la différenciation morphologique et la production de métabolites secondaires de certaines autres espèces de *Streptomyces* (Yamanaka 2005a). Dans le cadre de la thèse,

S. ambofaciens ATCC 23877 et *S. coelicolor* A3(2) ont été utilisées comme souches modèles. Elle sont connues pour produire, en condition de carence en fer, trois sidérophores de type tris-hydroxamate, la desferrioxamine B (forme hétéro-oligomères), E (forme macrocyclique) et la coelichéline (Barona-Gómez et al. 2004; Lautru et al. 2005) (Figure 20).

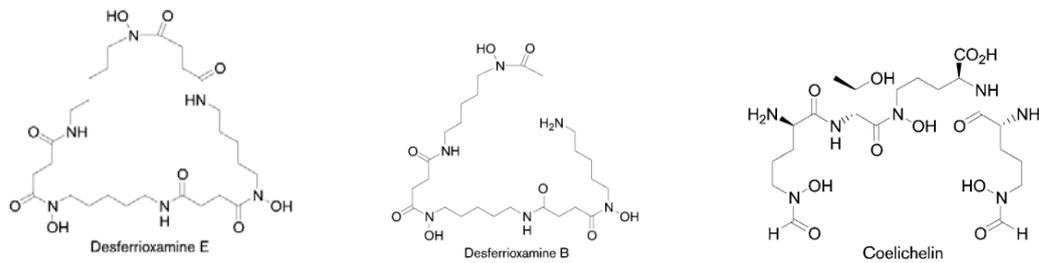


Figure 20 : Structures des sidérophores tris-hydroxamates desferrioxamines et coelichéline produits par *S. coelicolor*.

Les desferrioxamines sont un groupe de sidérophores contenant trois ligands d'acide hydroxamique, qui forment un complexe hexadenté, c'est-à-dire de six liaisons, avec le fer ferrique (Luckey et al. 1972; Schubert et al. 1999). L'analyse de la séquence du génome de *S. coelicolor* a révélé un groupe de six gènes, *desEFABCD*, qui dirigent la biosynthèse des desferrioxamines E et B. Le cluster *des* est également conservé chez *S. ambofaciens* (Barona-Gómez et al. 2004) (Tableau 1).

Tableau 1: Fonctions putatives proposées pour les protéines codées par le cluster *des* (Barona-Gomez et al. 2006)

Protein	Homologue (pourcentage identité)	Proposed function
DesA	Ddc <i>Acinetobacter baumannii</i> (37)	L-Lysine decarboxylase
DesB	AlcA <i>Bordetella bronchiseptica</i> (47)	1,5-Diaminopentane monooxygenase
DesC	AlcB <i>Bordetella bronchiseptica</i> (46)	Acyl CoA acyl transferase
DesD	AlcC <i>Bordetella bronchiseptica</i> (51)	Type C siderophore synthetase
DesE	FhuD <i>Bacillus subtilis</i> (24)	Ferric-siderophore lipoprotein receptor
DesF	ViuB <i>V. cholerae</i> (30)	Ferric-siderophore hydrolase

2.1.4. Compétition pour le fer : Piratage des sidérophores

En plus d'acquérir le fer via leurs propres sidérophores, de nombreuses bactéries possèdent des systèmes de détection de sidérophores qu'elles ne produisent pas. En effet, dans un environnement aussi concurrentiel que le sol, cette stratégie leur permet d'utiliser les sidérophores produits par d'autres organismes, des xénosidérophores. Cette stratégie est connue sous le nom de piratage de sidérophores (Luckey et al. 1972; Schubert et al. 1999).

Il existe un nombre croissant d'exemples où *Pseudomonas* spp. utilise des pyoverdines exogènes. Récemment, une étude sur les récepteurs TonB dépendants publiée par l'équipe

de Bodilis (Cornelis and Bodilis 2009) a révélé qu'une partie des récepteurs de sidérophores est conservée chez les différents représentants d'une espèce (le core récepteur) alors que d'autres ont été acquis par transfert horizontal. C'est pourquoi, les *Pseudomonas* sont capables d'utiliser les sidérophores produits par d'autres organismes grâce à la présence de différents récepteurs TonB dépendants dans leur membrane externe.

2.2. Résumé des résultats

2.2.1. *S. ambofaciens* ATCC 23877 utilise les sidérophores de *P. fluorescens* BBc6R8 et empêche la production de pyoverdine

Lors de la croissance de *P. fluorescens* BBc6R8 sur le milieu 26A, une pigmentation verte de la strie bactérienne est observée après 48h de croissance à 26,5°C. Cette pigmentation diffuse dans le milieu. La pigmentation devient fluorescente sous UV. *P. fluorescens* est connue pour produire, en condition de carence en fer, le sidérophore pyoverdine de type catécholate-hydroxamate, qui confère une couleur verte au milieu et est fluorescente sous UV. Lorsque du fer est ajouté dans le milieu 26A, cette pigmentation n'apparaît pas. Le milieu 26A serait donc carencé en fer, c'est pourquoi il induirait ainsi la production de pyoverdine chez *P. fluorescens* BBc6R8. Au cours de l'interaction entre *S. ambofaciens* ATCC 23877 et *P. fluorescens* BBc6R8 sur ce même milieu, la pigmentation et la fluorescence sont beaucoup plus faibles. Pour mieux comprendre le phénotype observé en absence et en présence de *S. ambofaciens* ATCC 23877, un agent chélateur de fer, le 2,2'-dipyridyle, a été ajouté dans le milieu gélosé 26A afin de complètement carencé le milieu en fer. Les résultats obtenus ont été similaires. *S. ambofaciens* ATCC 23877 est connue pour synthétiser notamment les sidérophores desferrioxamine D, E et la coelicheline, tous les trois de la famille des tris-hydroxamates. C'est pourquoi, une des hypothèses de travail a été qu'en présence de *S. ambofaciens*, *Pseudomonas* profiterait des sidérophores produits par *Streptomyces* et ne synthétiserait alors pas la pyoverdine. Afin de tester cette hypothèse, la souche *S. ambofaciens* ATCC 23877 a été préincubée 30h avant d'inoculer la souche BBc6R8, afin de lui laisser le temps de produire ses sidérophores. Dans ce cas-là, aucune pigmentation ni fluorescence n'est observée chez *P. fluorescens* BBc6R8. Ainsi, la présence du *Streptomyces*, notamment l'accumulation de ses sidérophores, empêcherait l'induction de la production de pyoverdine chez *P. fluorescens* BBc6R8.

Afin de tester la capacité du *Pseudomonas* à utiliser les sidérophores de *S. ambofaciens* ATCC 23877, de la déféroxamine mésylate purifiée, la desferrioxamine B, a été ajoutée dans le milieu de culture. Les résultats ont montré une absence de fluorescence dans ces conditions de culture.

Streptomyces coelicolor A3(2) produit les mêmes sidérophores que *S. ambofaciens* ATCC 23877 (Barona-Gómez et al. 2004; Lautru et al. 2005; Barona-Gomez et al. 2006). Des

cosmides mutés dans les gènes de biosynthèse de la desferrioxamine et de la coelicheline, respectivement *desD* et *cchH*, étaient disponibles au sein d'une librairie de cosmides de *S. coelicolor* mutés par insertion d'un transposon (Fernández-Martínez et al. 2011). C'est pourquoi, nous avons décidé d'interrompre ces gènes dans la souche *S. coelicolor* M512 (un dérivé de la souche A3(2) incapable de produire les antibiotiques pigmentés actinorhodine et undecylprodigiosine (Floriano and Bibb 1996)). Ces mutants ont ensuite été utilisés pour confirmer que la souche BBc6R8 utilise bien les desferrioxamines comme xénosidérophores mais aussi pour définir si elle est également en mesure d'utiliser la coelicheline. Les cocultures entre *P. fluorescens* BBc6R8 et les mutants de *S. coelicolor* *cchH* et *desD* ont révélé que *Pseudomonas* ne fluoresce pas en présence des simples mutants. Cependant, en présence de la souche *S. coelicolor* $\Delta des\Delta cch$, un double mutant déficient dans la biosynthèse de la desferrioxamine et coelicheline (Barona-Gomez et al. 2006), la production du pigment vert n'est pas affectée. Par conséquent, ces données montrent que *P. fluorescens* BBc6R8 a la capacité d'utiliser les ferrioxamines et la ferri-coelicheline et que dans ces conditions-là il ne produit alors plus la pyoverdine.

2.2.2. Impact de *S. ambofaciens* ATCC 23877 sur l'expression des gènes impliqués dans la synthèse des sidérophores de *P. fluorescens* BBc6R8

Afin d'analyser l'effet de *S. ambofaciens* ATCC 23877 sur l'expression des gènes impliqués dans la régulation et la synthèse de pyoverdine chez *P. fluorescens* BBc6R8, des analyses transcriptionnelles par PCR quantitative en temps réel ont été effectuées.

Les acteurs moléculaires impliqués dans la production de pyoverdine, codés par l'opéron *pvd*, ont été mis en évidence, ils sont présentés sur la Figure 21.

Différents acteurs interviennent dans la régulation de la synthèse, de l'import et de l'export de la pyoverdine. La protéine Fur joue un rôle central de par sa régulation génique à la fois négative et positive (Hantke 2001). Cette protéine se lie au cofacteur Fe^{2+} nécessaire à sa dimérisation. Lorsque le niveau de Fe^{2+} intracellulaire est élevé, Fur, lié à son corépresseur, se fixe au niveau d'une séquence cible, la boîte Fur, située dans la région promotrice de ses gènes cibles et réprime ainsi leur transcription (Escolar et al. 1999). En absence de fer, la protéine Fur se retrouve majoritairement sous forme « apo » et ne peut plus se dimériser, elle perd donc sa capacité de fixation à l'ADN, permettant ainsi la transcription des gènes cibles. Dans le cadre de la production de la pyoverdine, la protéine Fur régule négativement l'expression du gène *pvdS* qui code un facteur sigma alternatif. Lorsque la concentration en fer intracellulaire est faible, la répression par Fur est levée, PvdS dirige alors l'expression de l'opéron de gènes *pvd*, opéron comprenant l'ensemble des gènes nécessaires à la synthèse de la pyoverdine. Fur régule également l'opéron *fpvI-fpvR*. Fpvi est un facteur sigma alternatif quant à FpvR c'est un facteur anti-sigma membranaire. En conditions de carence en fer, la liaison de la ferripyoverdine à son récepteur de membrane externe FpvA déclenche

une cascade de signalisation, ce qui permet la dissociation du facteur sigma FpvI de son facteur anti-sigma FpvR et donc l'activation des gènes sous la dépendance de FpvI c'est-à-dire *fpvA*. FpvR contrôle également l'activité de *pvd* (Visca et al. 2002; Visca et al. 2007; Cornelis 2010) (Figure 21).

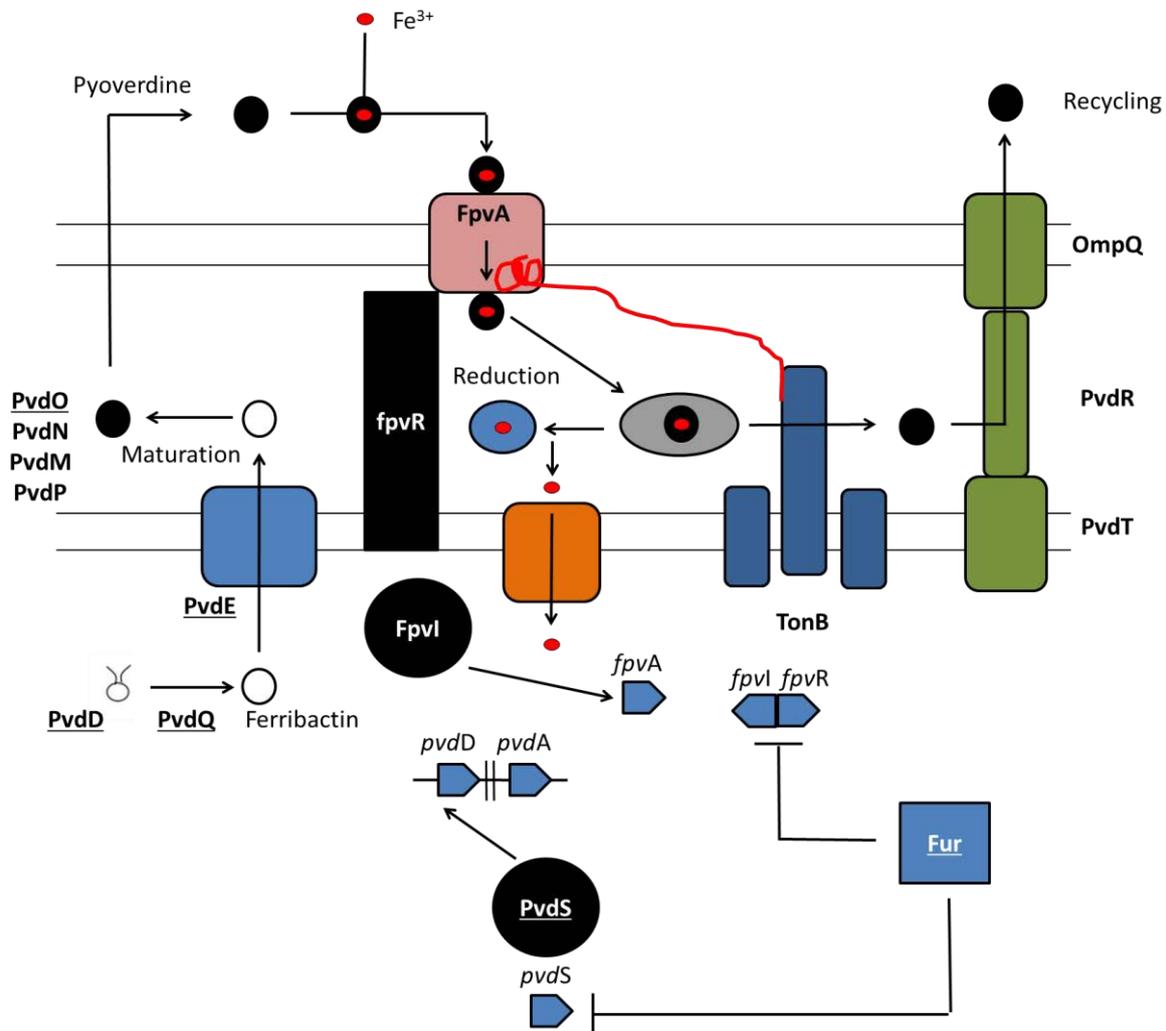


Figure 21 : Modèle de régulation du système de synthèse de la pyoverdine et de l'import et export de ferripyoverdine chez *P. aeruginosa* (Visca et al. 2002; Cornelis 2010).

Dans le cadre de la thèse, l'expression des gènes *pvdD*, *pvdQ*, *pvdS*, *pvdO*, *pvdE* a donc été analysée. L'expression d'un gène impliqué dans la synthèse de l'énantio-pyochéline, le second sidérophore de *P. fluorescens* BBc6R8, a également été étudiée.

Ces analyses ont révélé que l'expression de ces gènes n'est pas induite ou que très faiblement en présence de *S. ambifaciens* ATCC 23877. En revanche, les gènes impliqués dans la synthèse des desferrioxamines et de la coelicheline chez *S. ambifaciens* ATCC 23877, *desC* et *sam0552*, sont exprimés sur ce même milieu. Des analyses préliminaires de spectrométrie par NanoDESI ont permis de confirmer la présence de ces sidérophores dans le milieu 26A (analyses réalisées en collaboration avec le laboratoire de Peter Dorrenstein en

Californie). Ces résultats confirment bien que *S. ambofaciens* ATCC 23877 produit ses sidérophores sur le milieu 26A et qu'en leur présence, il y a non induction (ou très faible induction) de l'expression des gènes impliqués dans la production des sidérophores, pyoverdine et énantio-pyochéline, chez *P. fluorescens* BBc6R8.

2.2.3. *P. fluorescens* BBc6R8 capte les sidérophores de *S. ambofaciens* via un récepteur TonB-dépendant

Afin de déterminer les acteurs moléculaires impliqués dans le cadre de cette interaction, un criblage d'une banque de 4400 mutants aléatoires de *P. fluorescens* BBc6R8 obtenus par insertion d'un transposon Tn5 a été effectué. Des cocultures entre chacun des mutants et *S. ambofaciens* ATCC 23877 ont été réalisées sur milieu 26A gélosé. Ceci a permis d'identifier deux mutants, les mutants *P. fluorescens* P28H6 et P18B10 produisent toujours de la pyoverdine en présence de *S. ambofaciens* ATCC 23877. Ces deux souches sont mutées dans un même gène codant un récepteur de ferrioxamine TonB-dépendant, le récepteur FoxA. Tous ces résultats suggèrent que le récepteur FoxA de la souche BBc6R8 permettrait de détecter à la fois les ferrioxamines et la ferri-coelicheline produites par *S. ambofaciens* ATCC 23877.

Le récepteur FoxA est connu pour être un récepteur TonB dépendant capable de reconnaître les complexes des ferrioxamines-fer présents dans l'environnement. Des homologues sont présents chez *Salmonella enterica* serovar *Typhimurium* (Kingsley et al. 1999), *Yersinia enterocolitica*, (Bäumler and Hantke 1992), *Erwinia amylovora* (Dellagi et al. 1999), *P. aeruginosa* PAO1 (Llamas et al. 2006), *P. fluorescens* Pf0-1 et *P. protegens* Pf-5 (Hartney et al. 2011). Le gène *foxA* est présent au sein d'un opéron comprenant les gènes *foxA* (codant un facteur sigma ECF), *foxR* (codant un anti-facteur sigma). Cet operon est régulé par la protéine Fur. Un modèle de régulation de l'absorption du fer par les ferrioxamines via l'intermédiaire de FoxA chez *P. aeruginosa* PAO1 est présenté en Figure 22. La liaison de ferrioxamine au récepteur de la membrane externe FoxA génère un signal qui est transmis à la protéine FoxR. Cette protéine fonctionne comme un facteur anti-sigma et inhibe la fonction du facteur sigma ECF FoxA en l'absence de ferrioxamine. Après induction, FoxR se lie au complexe de l'ARN polymérase et le dirige vers la région promotrice de ses gènes cibles, ceux requis pour le transport de ferrioxamine (Llamas et al. 2006; Hannauer et al. 2010).

Chez *P. fluorescens* Pf0-1, *P. protegens* Pf-5 et *P. aeruginosa* PAO1, cet opéron est à côté du gène *pepSY* (codant une protéine transmembranaire). Les protéines PepSY sont des protéines transmembranaires retrouvées dans les canaux et les transporteurs, où elles interviennent sur la souplesse et la polarité nécessaire pour le transport à travers la membrane. L'analyse du génome de *P. fluorescens* BBc6R8 révèle la présence des gènes *foxA*, *foxR* et *pepSY*.

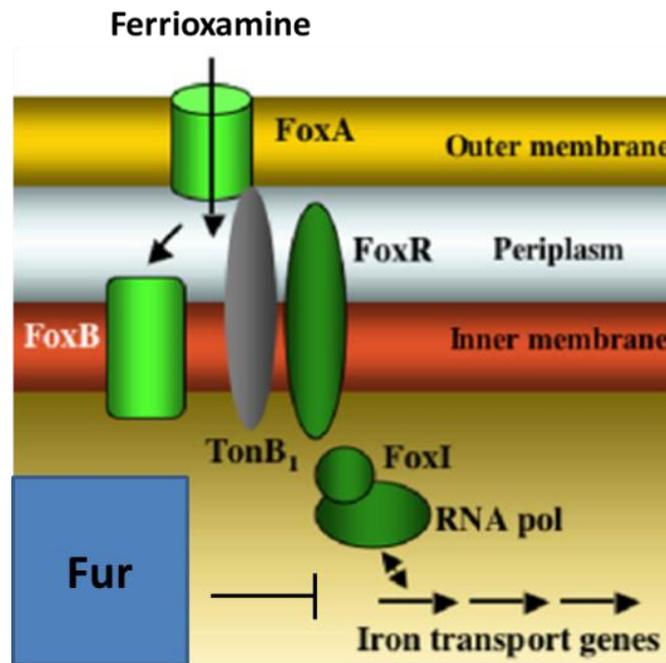


Figure 22 : Modèle de régulation de l'import de ferrioxamine chez *P. aeruginosa* par le récepteur TonB-dépendant FoxA (Hannauer et al. 2010).

Afin d'analyser l'impact de *S. ambofaciens* ATCC 23877 sur l'expression du gène *foxA*, *foxI* (facteur sigma ECF), *foxR* (facteur anti-sigma), des analyses transcriptionnelles par PCR quantitative ont été effectuées. L'expression du gène *pepSY* localisé à côté du gène *foxA* a également été analysée.

Les résultats ont révélé que l'expression de ces gènes est induite uniquement en présence de *S. ambofaciens* ATCC 23877. L'expression du gène *fur* codant le répresseur Fur a également été analysée. Fur détecte le taux intracellulaire de Fe^{2+} (Escobar et al. 1999). Lors de carence de fer, son rôle de répresseur est levé et les gènes sous son contrôle sont ensuite exprimés. Les résultats montrent que l'expression du gène *fur* est induite en absence et en présence de *S. ambofaciens* ATCC 23877. Son expression est constitutive. L'analyse des données génomiques de *P. fluorescens* BBc6R8 suggèrent que les gènes *foxI*, *foxR*, *foxA* et *pepSY* sont en opéron. Seul le gène *foxI* contiendrait une région de promotrice avec présence d'une box *fur* (AATGCGACTAATTATCATT). Cet opéron serait donc régulé par le répresseur Fur ainsi que par la présence de ferrioxamines dans le milieu via les facteurs sigma et anti-sigma FoxI et FoxR.

2.2.4. L'utilisation des desferrioxamines de *S. ambofaciens* ATCC 23877 est un phénomène répandu parmi d'autres *P. fluorescens* et *P. aeruginosa*

Pour déterminer la spécificité des résultats observés des cocultures entre *S. ambofaciens* ATCC 23877 et une banque de 60 souches de *Pseudomonas* fluorescents ainsi que *P. fluorescens* pf0-1, *P. protegens* pf-5, *P. fluorescens* Sbw25 et *P. aeruginosa* PAO1 ont été effectuées. Les 60 souches ont été isolées à partir d'un sol brute forestier ainsi que de l'ectomycorhizosphère et de l'ectomycorhize du pin Douglas (Frey-Klett et al. 2005). En présence de *S. ambofaciens* ATCC 23877, aucune de ces souches ne produit de pyoverdine ni de ferrioxamine B purifiée dans le milieu sauf pour *P. fluorescens* Sbw25. Contrairement à la souche Sbw25, *P. fluorescens* pf0-1, *P. protegens* pf-5 et *P. aeruginosa* PAO1 sont connues pour posséder l'opéron *fox* (Llamas et al. 2006; Hartney et al. 2011). Ces données sont donc en corrélation avec les phénotypes observés. En effet, elles suggèrent que la souche Sbw25 ne possède pas FoxA, cette dernière ne pourrait donc pas utiliser les sidérophores de *S. ambofaciens* ATCC 23877. Ceci explique ainsi pourquoi elle produit de la pyoverdine en présence de *S. ambofaciens* ATCC 23877. Ces résultats suggèrent également que chez la souche Sbw25, il n'y a pas d'autres récepteurs capables de capter les sidérophores de *S. ambofaciens* ATCC 23877.

2.3. Discussion

Notre travail met en évidence, pour la première fois, une interaction de compétition pour le fer entre les deux bactéries du sol, *Pseudomonas fluorescens* BBc6R8 et *Streptomyces ambofaciens* ATCC 23877. Le fer est un élément essentiel à la survie de tous les organismes. Il intervient dans de nombreux processus biologiques, cependant sa biodisponibilité est réduite dans des environnements aérobies tels que le sol. C'est pourquoi, les bactéries produisent des agents chélateurs de fer tels que les sidérophores. Certaines d'entre elles ont acquis la capacité de détecter et d'utiliser des sidérophores produits par d'autres organismes. Nos résultats démontrent que *S. ambofaciens* ATCC 23877 influe sur le métabolisme secondaire, en particulier sur la synthèse de sidérophores, de différents *Pseudomonas* fluorescents et de l'agent pathogène *P. aeruginosa* PAO1. Ainsi plutôt que de produire leurs propres sidérophores dans un milieu pauvre en fer, les différentes espèces de *Pseudomonas* étudiées ont développé des capacités de piratage leur permettant d'utiliser via leur récepteur FoxA les sidérophores produits par d'autres organismes dont *S. ambofaciens* ATCC 23877.

Nous avons mis en évidence, pour la première fois, que FoxA serait également capable de détecter le sidérophore coelicheline. Le récepteur FoxA est connu pour détecter une collection de dérivés de ferrioxamines. Le coprogène, un autre sidérophore de type tris hydroxamate est également reconnu par FoxA (Deiss et al. 1998). Ces données renforcent ainsi le fait que FoxA pourrait détecter d'autres sidérophores de type tris hydroxamate

autres que les ferrioxamines comme la ferri-coelichelin par exemple. Ce serait donc un récepteur à large spectre.

Dans la littérature, des récepteurs à large spectre sont connus. Chez *S. ambifaciens* ATCC 23877 et *S. coelicolor* A3(2) par exemple, la synthèse des desferrioxamines et coelicheline est dirigée par deux voies indépendantes mais co-régulées, impliquant les clusters *des* et *cch* (Figure 2). Trois systèmes de transport de ces sidérophores existent, mais chacun d'entre eux présente des sélectivités différentes. Ces systèmes sont codés par les clusters *des* et *cch*, le troisième système est codé par le locus *cdt* (*cdtABC*). La protéine CdtB, une protéine de liaison aux ferri-sidérophores, est capable de se lier aux ferrioxamines et à la ferri-coelichelin (Barona-Gomez et al. 2006; Patel et al. 2010). Par ailleurs, la seconde protéine de liaison aux ferri-sidérophores, DesE, est capable de se lier à différents sidérophores de type tris-hydroxamates mais pas à la ferri-coelichelin (Patel et al. 2010). Ainsi posséder des sidérophores à large spectre peut être une stratégie choisie au cours de l'évolution pour être plus compétitif dans le sol.

Contrairement à de nombreuses études où le phénomène de piratage des sidérophores est démontré de manière indirecte (Champomier-Vergès et al. 1996; Barelmann et al. 2003; Yamanaka 2005b; Joshi et al. 2006; Veggi et al. 2012; Funahashi et al. 2012; Miethke et al. 2013; Tomaras et al. 2013) comme l'ajout de sidérophore purifié dans le milieu, notre étude met en évidence par une interaction directe entre les deux bactéries du sol *Streptomyces* et *Pseudomonas*.

Le phénomène de piratage observé peut s'expliquer par le fait que dans un environnement concurrentiel tel que le sol, il est plus avantageux d'utiliser les sidérophores produits par ses voisins plutôt que de produire ses propres sidérophores. Ceci permet d'économiser de l'énergie et en même temps d'utiliser les ressources des autres compétiteurs. Il est important de préciser que le composé le plus efficace pour capter le fer est la desferrioxamine, suivie par la pyoverdine et enfin la pyochéline (Srifuengfung et al. 2010). De plus, la pyoverdine est coûteuse à produire métaboliquement (Dumas et al. 2013) et les desferrioxamines sont synthétisées par de nombreux organismes du sol (Müller and Raymond 1984; Meiwes et al. 1990; Martinez et al. 2001; Essén et al. 2007a; Nett et al. 2009). En effet, la production de ces sidérophores de type hydroxamate semble être conservée chez les Streptomycètes (Müller and Raymond 1984; Meiwes et al. 1990). Les gènes *desABCD* qui dirigent la synthèse de ces agents chélateurs (Barona-Gómez et al. 2004; Kadi et al. 2007) ont été trouvés dans tous les génomes de *Streptomyces* séquencés et dans d'autres genres apparentés, tels que *Salinispora* (Nett et al. 2009).

Ainsi, la stratégie utilisée, potentiellement sélectionnée au cours de l'évolution, par *Pseudomonas* semble très avantageuse puisqu'en plus de ne pas produire ses propres sidérophores, et donc d'économiser son énergie, il utilise des sidérophores de très haute affinité, produits par de nombreux microorganismes environnants, grâce à un récepteur à large spectre.

L'utilisation de desferrioxamines en tant que xénosidérophores est répandue dans les sols. D'Onofrio et al. ont montré qu'un groupe d'isolats de sédiments marins *a priori* incultivables en laboratoire ne poussent qu'en présence de souches auxiliaires qui produisent des sidérophores de type acyl- desferrioxamines (D'Onofrio et al. 2010).

De même, en plus de la synthèse d'un sidérophore hautement spécifique, l'amycheline, les bactéries *Amycolatopsis* AA4 piratent également les desferrioxamines de *S. coelicolor*. L'interaction influe sur l'expression des gènes du développement chez *Streptomyces* bloquant la formation de mycélium aérien. En retour, l'utilisation de desferrioxamines conduit à une absence d'induction de gènes impliqués dans le métabolisme du fer chez *Amycolatopsis* (Traxler et al. 2012).

Ainsi que ce soit pour *Pseudomonas* ou d'autres bactéries, une stratégie multiple d'acquisition du fer permet de prendre l'avantage face à des compétiteurs potentiels.

Une discussion plus générale des résultats sera détaillée dans la partie Discussion de ce manuscrit de thèse.

3. Dialogue moléculaire entre *S. ambofaciens* ATCC 23877 et *P. fluorescens* BBc6R8

Lors du criblage, une deuxième interaction a été mise en évidence entre *S. ambofaciens* ATCC 23877 et *P. fluorescens* BBc6R8 sur le milieu R2. Ce milieu favorise notamment la production de l'antibiotique kinamycine chez *S. ambofaciens* ATCC 23877 (Bunet et al. 2008). La partie Matériels et Méthodes est présentée dans le chapitre 4 Annexes.

3.1. Quorum sensing et synthèse de l'antibiotique kinamycine chez *S. ambofaciens* ATCC23877

3.1.1. *S. ambofaciens* ATCC23877 et le cluster *alp*

Le cluster responsable de la synthèse de la kinamycine a été nommé, cluster « *alp* ». Trois formes de kinamycine ont été identifiées mais seront désignées sous le terme de kinamycine dans le reste du manuscrit (Bunet et al. 2011). Le cluster *alp* est également impliqué dans la production d'un pigment orangé probablement issu de la dégradation ou de la modification enzymatique de la kinamycine (Pang et al. 2004). Le cluster *alp* mesure environ 35 kb et comporte 27 gènes (Figure 23). Il est présent en deux copies sur le chromosome, chacune étant située au niveau des répétitions terminales inversées (« TIR »). Les TIR sont des structures caractéristiques des réplicons linéaires des *Streptomyces* et leur taille varie de moins de 200 pb à 450 kb selon l'espèce considérée (200 kb chez *S. ambofaciens*).

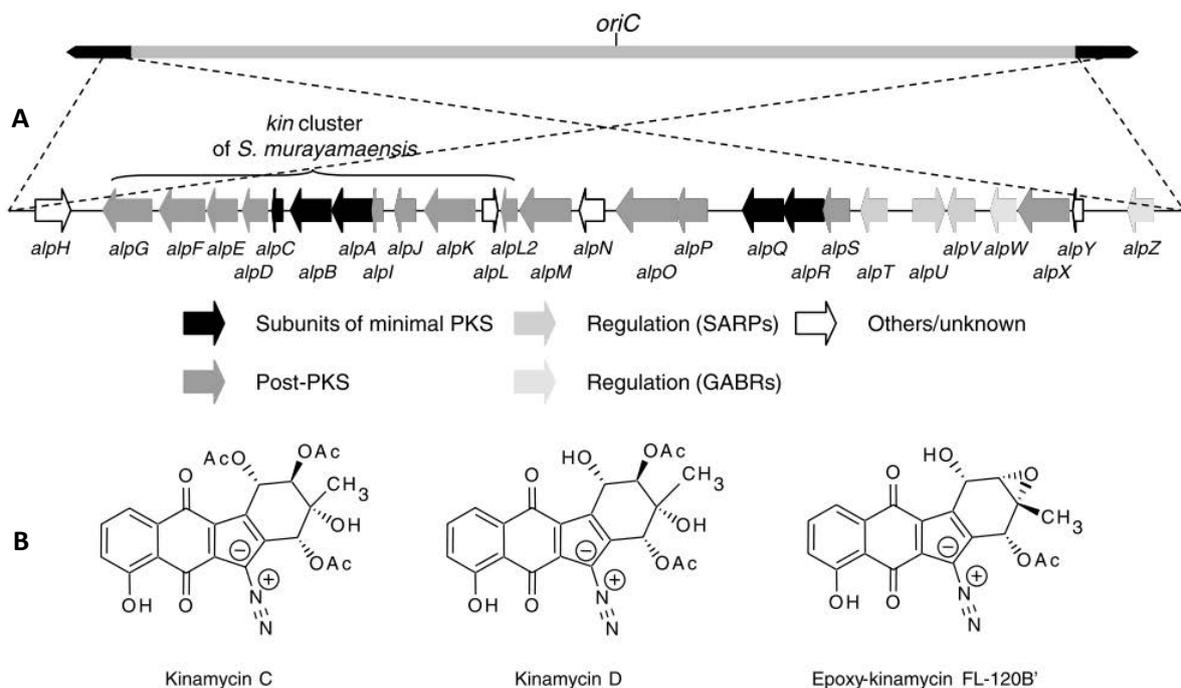


Figure 23 : Cluster de gènes responsable de la biosynthèse de la kinamycine chez *S. ambofaciens* ATCC 23877. (A) Localisation chromosomique et organisation génétique du cluster de gènes *alp*. Les flèches noires aux extrémités du chromosome représentent les répétitions inversées terminales. (B) Structures chimiques des différentes kinamycines identifiées chez *S. ambofaciens* ATCC 23877. (Bunet et al. 2008)

3.1.2. Modèle de régulation du cluster *alp*

Le cluster *alp* contient cinq gènes codant des régulateurs transcriptionnels : *alpT*, *alpU*, *alpV*, *alpW* et *alpZ*. Trois de ces gènes codent des protéines similaires aux membres de la famille SARP « *Streptomyces* antibiotic regulatory proteins », il s'agit des protéines AlpV, AlpU et AlpT (Pang et al. 2004; Aigle et al. 2005). Seuls les actinomycètes, dont font partie les streptomycètes, possèdent cette famille de régulateurs. La région N-terminale des SARP contient un domaine BATD (pour « Bacterial Transcriptional Activation Domain »). Les protéines SARP AlpV et AlpT agissent comme des activateurs transcriptionnels et sont des régulateurs ultimes contrôlant directement l'expression de gènes de biosynthèse de la kinamycine tels qu'*alpA* (Aigle et al. 2005). AlpU quant à lui est un activateur accessoire.

Les produits des deux autres gènes, AlpZ et AlpW, appartiennent à la famille des régulateurs GABR (GAMMAButyrolactone Receptor) (Ramos et al. 2005). Les protéines GABR reconnaissent des sites particuliers de fixation, les motifs ARE, retrouvés dans la région promotrice de leurs gènes cibles.

Les protéines de type GABR sont des protéines dont l'activité est régulée par des molécules signal (ou ligand) de la famille des γ -butyrolactones, des avénolides, des buténolides ou encore des furannes. Il a été démontré récemment qu'une étape clé de la synthèse de ces molécules signal est catalysée par une même famille de protéines, les enzymes AfsA (Kato et al. 2007). Cependant, ce ne serait pas le cas des avénolides. L'analyse des séquences adjacentes au cluster *alp* a révélé la présence d'un gène codant une protéine de cette famille. Il s'agit d'un gène dupliqué, *sam0196*, situé à l'extrémité des TIRs. La délétion de ce gène montre que le rôle de son produit serait bien responsable de la synthèse du ligand régulateur d'AlpZ. D'autre part, un motif ARE est présent dans la région promotrice de *sam0196*, suggérant ainsi que lui aussi soit régulé par AlpZ.

Des travaux antérieurs permettent d'exclure que le ligand d'AlpZ soit la kinamycine ou un intermédiaire de sa biosynthèse. En effet chez un mutant *S. ambofaciens* délété pour les gènes codant les enzymes de biosynthèse de la kinamycine, la présence du ligand est observée (Bunet et al. 2011).

Les caractéristiques physico-chimiques du ligand autorégulateur d'AlpZ ont révélé que le ligand ne présente pas les caractéristiques typiques des γ -butyrolactones. Alors que ces dernières sont sensibles à un traitement alcalin (ouverture irréversible du noyau lactone), le

ligand régulateur d'AlpZ conserve son activité après traitement à pH élevé. Le ligand ne posséderait donc pas de noyau lactone. Les MMFs, identifiées chez *S. coelicolor* sont également résistants à un traitement à pH alcalin (O'Rourke et al. 2009). Le ligand d'AlpZ pourrait donc posséder un noyau furanne lui aussi et appartenir à la même famille que les MMFs.

L'analyse des mutants délétés pour les gènes *alpZ*, *alpW*, *alpV*, *alpU* et *alpT* (délétion des deux copies présentes à chaque extrémité chromosomique) a permis de déterminer leur rôle respectif et de proposer une cascade de régulation aboutissant à la production de kinamycine (Bunet et al. 2008) (Figure 24).

En phase exponentielle de croissance, la protéine AlpZ réprime l'expression, notamment, des gènes *alpZ*, de l'opéron *alpXW*, *alpV*, *alpT* et d'*alpU*, en se fixant au niveau du motif ARE localisé dans la région promotrice de ces gènes. Au début de la phase de transition, il y a synthèse ou atteinte d'une concentration seuil d'une molécule signal, qui se fixe à AlpZ. Il s'agit d'un mécanisme de quorum sensing. Ainsi, en présence du ligand, AlpZ est dissociée de ses sites cibles, ce qui permet alors la transcription des gènes. Les protéines AlpV et AlpT atteindraient alors une concentration suffisante pour induire l'expression des gènes de biosynthèse (*alpA*), conduisant à la production de l'antibiotique kinamycine et du pigment orange. En parallèle, la transcription du gène *alpW* est également induite et l'accumulation de son produit se traduirait par la fixation du répresseur sur ses sites cibles. Cette fixation aurait comme conséquence la répression de l'expression du gène de biosynthèse de l'antibiotique et aboutirait donc à l'arrêt de la synthèse de kinamycine en phase stationnaire tardive. L'accumulation d'AlpZ et/ou la dégradation du ligand pourraient également participer à cet arrêt.

En parallèle, des résultats préliminaires (Jacquet T, DEA, 2006 et Galet J, Master 2, 2010) ont mis en évidence qu'AlpZ jouerait un rôle positif dans l'induction de l'expression de *samL/R0196*. Ainsi AlpZ qui est connue comme répresseur transcriptionnel dans la cascade de régulation du cluster *alp*, pourrait présenter un rôle positif dans la régulation des gènes *samL/R0196*. Un constat similaire a également pu être fait chez *S. lavendulae* FRI-5 (Kitani et al. 2010). Ces données témoigneraient de la présence d'un système d'auto-induction. En effet, la présence de ligand exogène augmenterait la transcription des gènes *samL/R0196*, permettant ainsi une hausse de la synthèse endogène du ligand. La molécule signal atteindrait alors une concentration seuil ce qui activerait la cascade de régulation aboutissant à la production de kinamycine. Ainsi le mécanisme d'auto-induction aurait pour rôle l'amplification du signal. Il est possible de suggérer qu'une ou peut-être plusieurs protéines régulatrices du cluster *alp* entrent en jeu afin d'exercer un rôle médiateur. Un des acteurs protéiques qui pourrait jouer ce rôle de médiateur est la protéine AlpZ. En effet, il est possible que la fixation de la molécule signal par AlpZ enclenche alors son rôle de régulateur positif envers les gènes *samL/R0196*.

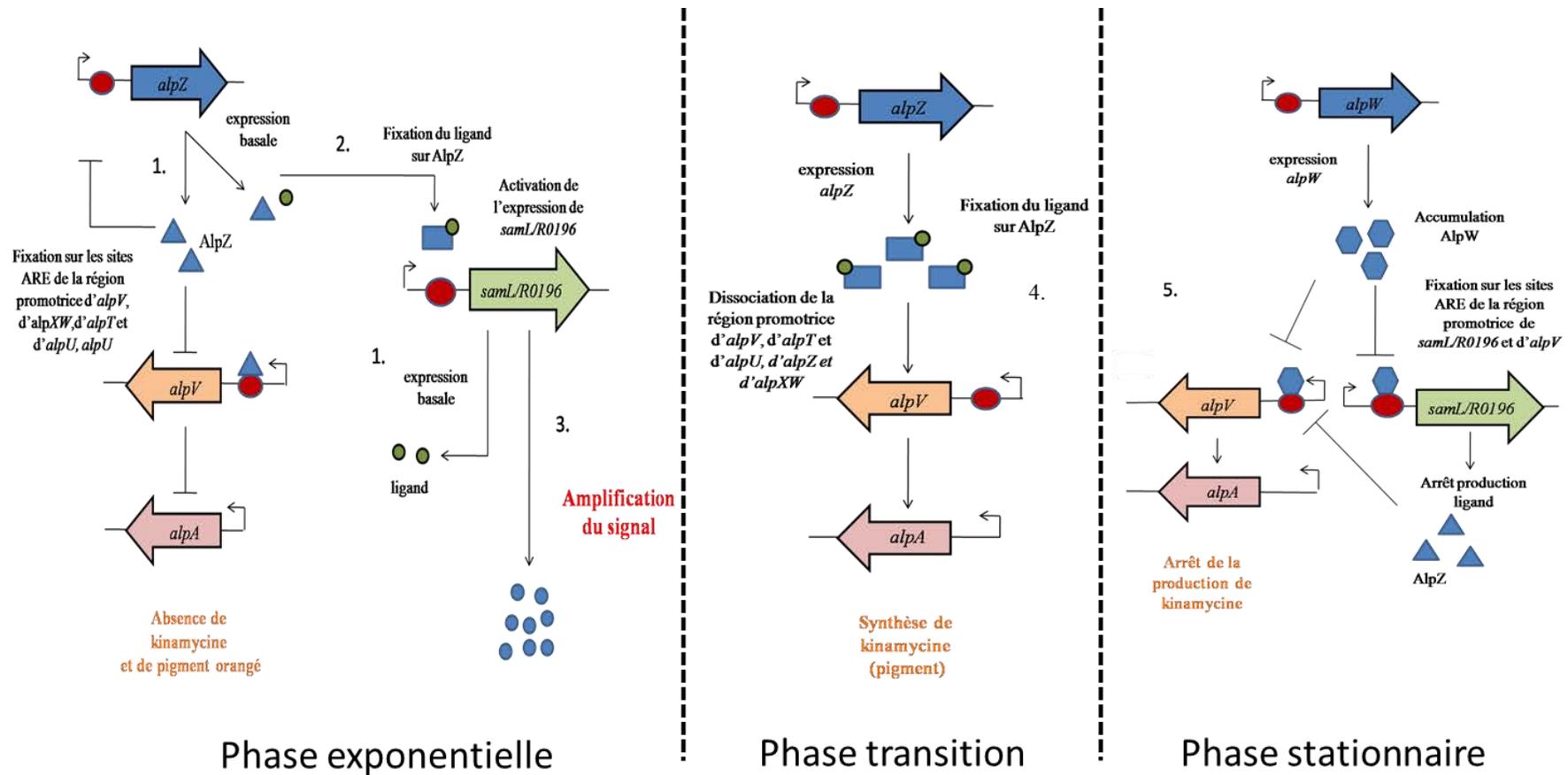


Figure 24 : Modèle de régulation du cluster *alp*.

Ainsi, la régulation de la synthèse de la kinamycine est un mécanisme fin et multifactoriel. Elle implique de nombreux acteurs. La synthèse d'actinorhodine et de γ -actinorhodine, chez *S. coelicolor* A3(2), est également contrôlée, régulée par de nombreux paramètres.

3.2. Résultats

3.2.1. Effet inhibiteur de *P. fluorescens* sur la synthèse de kinamycine chez *S. ambofaciens*

Nous avons observé qu'en présence de *P. fluorescens* BBc6R8, il n'y a pas d'apparition du pigment orangé chez *S. ambofaciens*. En effet, sur ce milieu, la coloration orangée du mycélium de *S. ambofaciens* ATCC 23877 ainsi que la diffusion du pigment apparaît après 3 jours de croissance à 26,5°C alors qu'en présence de *Pseudomonas*, la strie ne se colore pas (Figure 25A et B) même après dix jours d'incubation. L'absence de pigmentation tend à suggérer qu'il y aurait absence de cet antibiotique en présence de la souche BBc6R8. Pour vérifier cette hypothèse, des tests de bioactivité ont été effectués à partir de ces cultures à l'aide de *B. subtilis*, une bactérie sensible à la kinamycine. Les résultats montrent l'apparition d'une zone d'inhibition de croissance de *B. subtilis* lorsque *Streptomyces* est cultivée seule. En revanche, aucune zone n'est visible en présence de *P. fluorescens* BBc6R8 (Figure 25C et D). Ces données suggèrent donc que *P. fluorescens* BBc6R8 empêcherait l'export ou la production de l'antibiotique kinamycine par *S. ambofaciens* ATCC 23877.

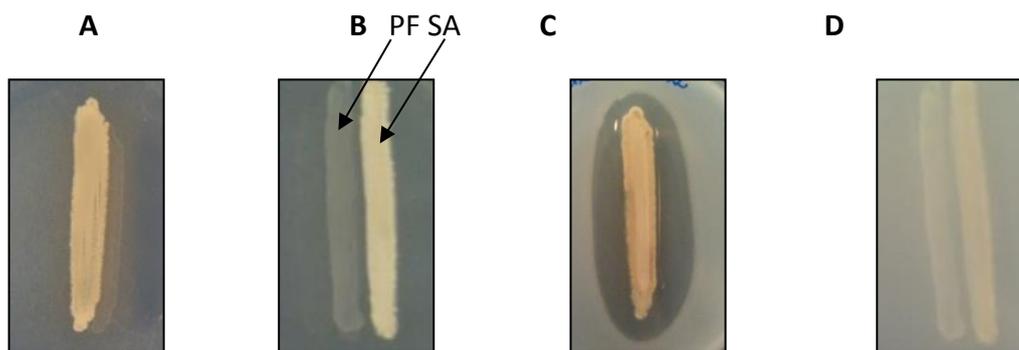


Figure 25 : Influence de *P. fluorescens* BBc6R8 sur la synthèse de l'antibiotique kinamycine produit par *S. ambofaciens* ATCC23877.

Strie de *S. ambofaciens* ATCC23877 (A) et coculture entre *S. ambofaciens* ATCC 23877 (SA) et *P. fluorescens* BBc6R8 (PF) (B) sur milieu gélosé R2. Incubation à 26,5°C pendant 5 jours. Tests de bioactivité, réalisés avec la souche indicatrice *B. subtilis* (sensible à la kinamycine), à partir de la culture de *S. ambofaciens* seule (C) et de la coculture (D).

Ainsi, l'une des hypothèses posées a été que *Pseudomonas* empêchait l'export de l'antibiotique. Afin de le déterminer, l'extraction de l'antibiotique présent au niveau intracellulaire a été réalisée pour chacune des cultures. L'extraction a été effectuée avec de l'acétate d'éthyle (solvant utilisé pour extraire les kinamycines à partir de cultures liquides) et au méthanol, un autre solvant utilisé pour l'extraction d'antibiotiques. Les tests de

bioactivité effectués à partir des extraits obtenus montrent que lorsque *S. ambofaciens* est cultivée seule, une zone d'inhibition de croissance de la souche indicatrice *B. subtilis* est observée. En revanche, en présence de de la souche BBc6R8, cette zone n'est pas retrouvée (Figure 26). L'antibiotique n'est donc pas présent de manière intracellulaire. Ces résultats indiquent que l'absence de kinamycine en présence de la souche BBc6R8 ne proviendrait donc pas d'un blocage du transport de l'antibiotique mais plutôt d'un impact sur sa synthèse. L'ensemble de ces résultats révèle ainsi un effet inhibiteur de *P. fluorescens* BBc6R8 sur la synthèse de kinamycine (ou d'un intermédiaire actif) chez *S. ambofaciens* ATCC23877 et non pas sur l'export de l'antibiotique.

A

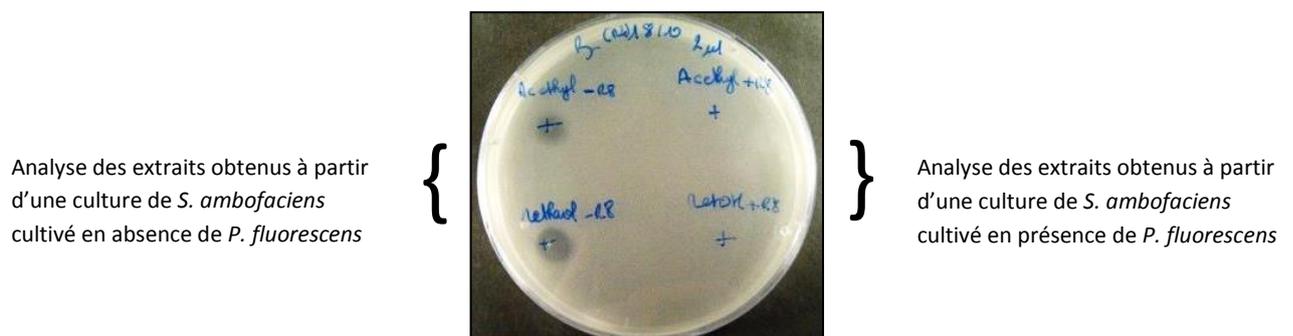


Figure 26 : Inhibition de la synthèse de l'antibiotique kinamycine de *S. ambofaciens* ATCC23877 par *P. fluorescens* BBc6R8.

Test de bioactivité, réalisé avec la souche indicatrice *B. subtilis*, à partir des extraits intracellulaires de *S. ambofaciens* cultivée en absence (à gauche) ou présence (à droite) de *P. fluorescens* BBc6R8. Extraction à l'acétate d'éthyle (en haut) ou au méthanol (en bas).

3.2.2. Effet de *P. fluorescens* BBc6R8 sur l'expression du gène *alpV*

L'hypothèse ainsi privilégiée est que *P. fluorescens* BBc6R8 impacterait la synthèse de kinamycine. C'est pourquoi, nous nous sommes alors intéressés aux gènes impliqués dans la cascade de régulation de cet antibiotique et notamment à leur expression.

Parmi les souches biosenseurs réalisées dans le cadre de la thèse, l'une d'entre elle permet d'analyser l'impact d'autres microorganismes sur la synthèse de kinamycine et notamment leur impact sur l'expression du gène codant le régulateur transcriptionnel AlpV. Ce régulateur est un activateur transcriptionnel impliqué dans l'activation des gènes de biosynthèse de la kinamycine. La région promotrice du gène codant le régulateur AlpV a été clonée en amont du gène rapporteur *egfp* porté par le plasmide conjugatif intégratif pIJ8660 (Sun et al. 1999). L'ensemble a ensuite été introduit chez *S. ambofaciens* où le plasmide s'intègre dans le génome par recombinaison site-spécifique.

Comme *P. fluorescens* BBc6R8 influencerait la production de kinamycine, nous avons voulu savoir si la cascade de régulation impliquée dans la synthèse de l'antibiotique était affectée en sa présence et notamment l'expression d'*alpV*. La souche biosenseur a donc été cultivée pendant 46h sur milieu R2 gélosé en microplaque seule ou en présence de *P. fluorescens* BBc6R8. La détection de la fluorescence est réalisée par un lecteur de microplaques (Biotek Synergy HT). Les résultats obtenus montrent l'absence de pic de fluorescence en présence de *Pseudomonas* (Figure 27) contrairement à ce qui est observé lorsque la souche de *Streptomyces* est cultivée seule. *P. fluorescens* BBc6R8 seule ne fluoresce pas. Ainsi en présence de *P. fluorescens* BBc6R8, il y a absence d'induction d'expression du gène *alpV* chez *S. ambofaciens* ATCC 23877, ce qui est cohérent avec l'absence de production de l'antibiotique kinamycine.

Ainsi, *P. fluorescens* affecterait la production de cet antibiotique en agissant au niveau de la cascade de régulation impliquée dans la synthèse de ce métabolite secondaire et plus particulièrement au niveau de l'expression du gène codant l'activateur transcriptionnel AlpV.

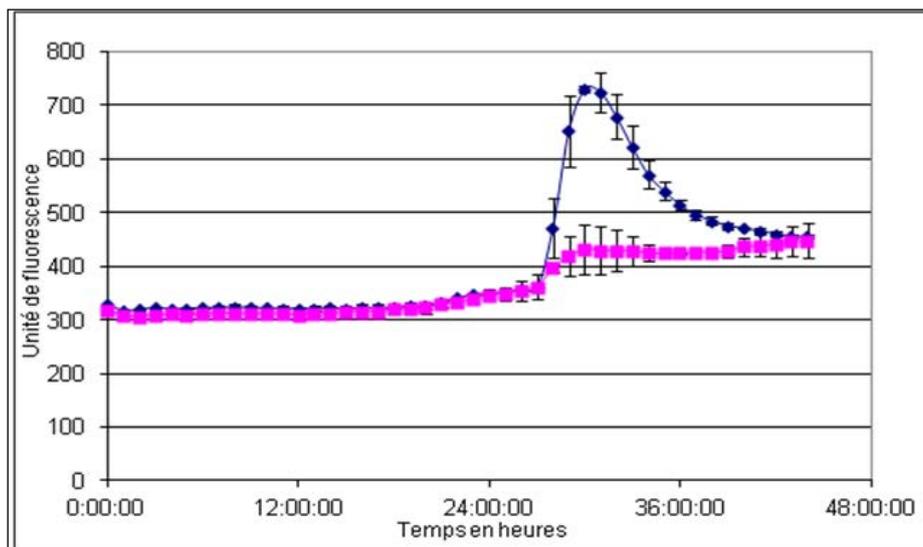


Figure 27 : Inhibition de l'expression du gène *alpV* chez *S. ambofaciens* ATCC23877 par *P. fluorescens* BBc6R8.

Courbe de fluorescence (en unité de fluorescence en fonction du temps) obtenue à partir des cultures de la souche biosenseur cultivée en absence (bleu) ou présence (rose) de *P. fluorescens* BBc6R8 pendant 46h sur milieu R2 gélosé à 26,5°C.

3.2.3. Effet de *P. fluorescens* BBc6R8 sur la voie de régulation contrôlant la synthèse de kinamycine

Pseudomonas agit donc sur l'expression d'*alpV*. L'objectif suivant a donc été de déterminer s'il avait uniquement un effet sur l'expression du gène codant ce régulateur transcriptionnel ou s'il avait également un effet sur les autres acteurs de cette voie de biosynthèse. Des analyses transcriptionnelles par RT-PCR et PCR quantitative en temps réel (qPCR) de l'expression des différents gènes de la cascade ont donc été réalisées au cours du temps (41h à 64h) à partir d'ARN extraits de cultures de *S. ambofaciens* seule ou de *S. ambofaciens* en coculture avec *P. fluorescens* BBc6R8.

Les gènes étudiés sont ceux constituant la voie de régulation et biosynthèse de la kinamycine : le gène impliqué dans la synthèse de la molécule signal, *samL/R0196*, les gènes régulateurs *alpZ*, *alpW*, *alpV*, *alpT* et *alpU* et l'un des gènes de biosynthèse, *alpA*. Ce dernier code une céto-synthase, enzyme impliquée dans la production de l'antibiotique.

Dans un premier temps, l'analyse transcriptionnelle s'est portée sur le gène *alpA* puisque c'est un gène dont l'expression est directement régulée par AlpV. Les résultats montrent qu'en présence de *P. fluorescens*, il y a une forte réduction de la transcription du gène *alpA*, la réduction est d'un facteur 14 à 46,5h, ce qui est cohérent avec l'absence de production de l'antibiotique (Figure 28).

Par la suite, les analyses se sont portées sur l'expression du gène *alpZ* puisque le régulateur qu'il code régule directement l'expression du gène *alpV*. Contrairement au pic d'expression de ce gène observé chez *S. ambofaciens* cultivée seule, il n'y a qu'une légère induction de l'expression de ce gène en présence de *P. fluorescens* BBc66R8 (Figure 28).

Les analyses se sont ensuite focalisées sur l'expression des gènes *alpT*, *alpW* et *alpU* puisque ces derniers sont contrôlés par AlpZ. De la même manière, il n'y a qu'une légère induction de l'expression de ces gènes lorsque *S. ambofaciens* ATCC 23877 est cultivée en présence de *P. fluorescens* BBc66R8, alors que le pic est marqué lorsqu'elle est cultivée seule.

Enfin, l'expression du gène *sam0196* a été analysée. Son produit intervient dans la synthèse de la molécule signal qui contrôle l'activité régulatrice de la protéine AlpZ. Cette molécule se trouve donc en amont de la cascade de régulation de la synthèse de la kinamycine. Les résultats révèlent que l'expression du gène est très fortement réduite en présence du *Pseudomonas* (Figure 28).

Ainsi, contrairement à ce qui est observé chez *S. ambofaciens* cultivée seule, il n'y a qu'une légère induction de l'expression de *sam0196*, *alpZ*, *alpW*, *alpV*, *alpT* et *alpU* en présence de *P. fluorescens* BBc66R8. Cette induction ne serait donc pas assez forte pour enclencher la cascade de régulation et aboutir à l'induction de l'expression des gènes de biosynthèse (dont *alpA*) et donc à la synthèse de kinamycine.

Les profils d'expression observés sont bien en corrélation avec les phénotypes des cultures. En effet, à partir de ces cultures de *S. ambofaciens* et de cocultures entre *S. ambofaciens* et *P. fluorescens*, qui ont servi à l'extraction des ARN, les phénotypes de pigmentation et de bioactivité ont été analysés au cours des différents temps de culture. Les résultats résumés dans le Tableau 2 montrent bien qu'en présence de *P. fluorescens*, *S. ambofaciens* ne présente ni pigmentation ni d'activité contre *B. subtilis*.

Ainsi, *P. fluorescens* affecte la production de kinamycine en agissant au niveau de la régulation de la voie de biosynthèse de ce métabolite secondaire.

Tableau 2 : Phénotypes (bioactivité et pigmentation) observés au cours du temps lors de cultures de *S. ambofaciens* ATCC23877 cultivé en absence ou présence de *P. fluorescens* BBc6R8 sur milieu R2 gélosé à 26,5°C. L'extraction ARN a été réalisée pour chacun des temps analysés.

	Temps de culture	41h	42h30	43h45	45h	46h30	48h	48h45	64h
En absence de <i>P. fluorescens</i>	bioactivité	-	-	-	-	+	+	+	+
	pigmentation	-	-	-	-	-	-	-	+
En présence de <i>P. fluorescens</i>	bioactivité	-	-	-	-	-	-	-	-
	pigmentation	-	-	-	-	-	-	-	-

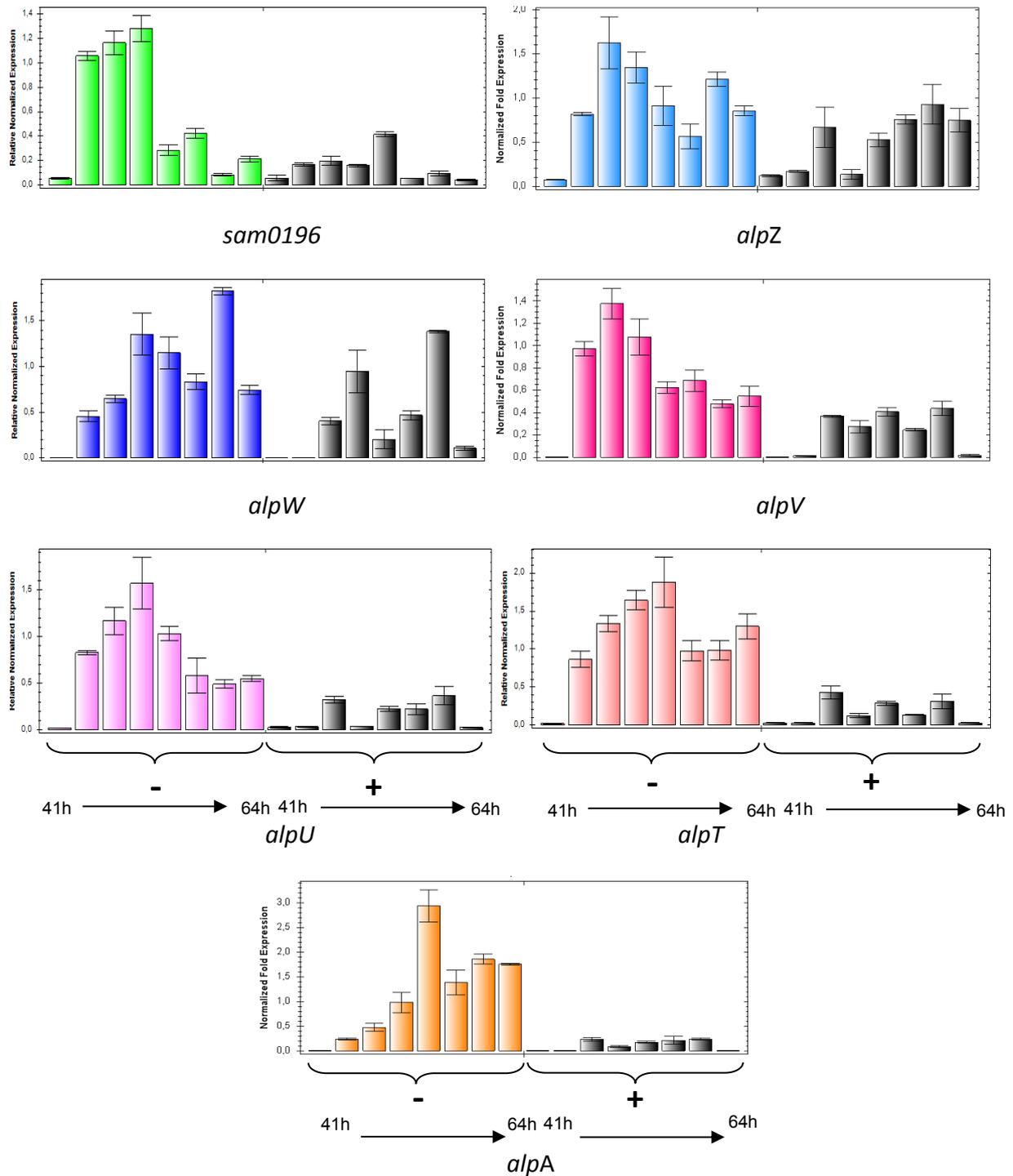


Figure 28 : Expression des gènes impliqués dans la cascade de régulation de la kinamycine chez *S. ambifaciens* ATCC23877 cultivé en absence (-) ou présence (+) de *P. fluorescens* entre 41h et 64h de croissance à 26,5°C (Tableau 1). Analyse réalisée par qPCR.

3.2.4. Effet de *P. fluorescens* BBc6R8 sur la molécule de QS régulant la synthèse de kinamycine chez *S. ambofaciens* ATCC 23877

Comme expliqué précédemment, la molécule signal, en se fixant sur AlpZ, permettrait de stimuler l'expression des gènes *samL/RO196*. Ceci se traduirait par une augmentation de la synthèse de cette molécule signal et par conséquent l'induction de la cascade de régulation aboutissant à la production de kinamycine. En présence de *P. fluorescens* BBc6R8, l'expression des gènes de la cascade de régulation sont faiblement induits. Ceci pourrait être dû à une concentration trop faible en molécule signal, ne permettant alors pas d'enclencher la boucle de régulation positive.

C'est pourquoi, l'une des hypothèses émises est que *P. fluorescens* BBc6R8 influencerait la quantité de molécule signal, par exemple en la dégradant. Afin de tester cette hypothèse, des cocultures entre le mutant de *S. ambofaciens* délété pour les deux copies du gène *alpZ* (Bunet et al., 2008) et *P. fluorescens* BBc6R8 ont été réalisées sur milieu R2 gélosé. Ce mutant a un comportement « indépendant » de la molécule signal. En effet, le régulateur AlpZ étant absent, la molécule signal n'est pas requise pour lever la répression de ce régulateur au niveau des gènes codant les activateurs transcriptionnels, la cascade de régulation est donc activée de manière précoce (Figure 29A). Les phénotypes de pigmentation observés et les tests de bioactivité réalisés montrent l'absence d'effet de *P. fluorescens* sur la synthèse de kinamycine chez cette souche délétée pour $\Delta\Delta alpZ$ (Figure 29B). Cela signifie que la gamma protéobactérie a un effet en amont de l'action d'AlpZ. L'effet de *P. fluorescens* BBc6R8 sur la souche sauvage de *S. ambofaciens* ATCC 23877 pourrait donc se situer au niveau de la molécule signal.

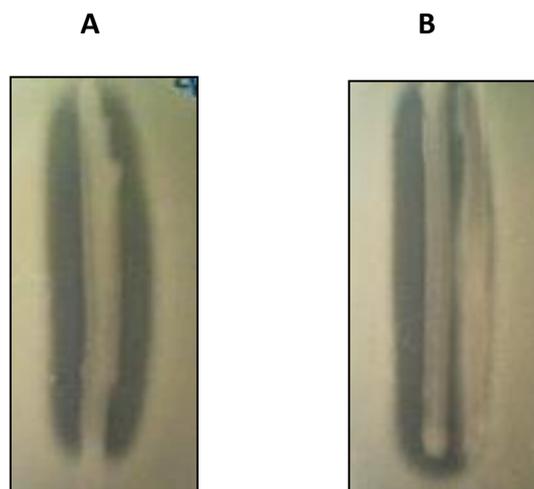


Figure 29 : Synthèse de kinamycine par *S. ambofaciens* $\Delta\Delta alpZ$ en absence ou en présence de *P. fluorescens* BBc6R8. Tests de bioactivité, réalisés avec la bactérie indicatrice *B. subtilis*, à partir des cultures de la souche de *S. ambofaciens* délétée pour le gène *alpZ* cultivée en absence (A) ou présence de *P. fluorescens* (B).

3.2.5. Implication d'un dialogue moléculaire, « effet-ping-pong » ?

Dans la nature, certains microorganismes sont capables d'inhiber chez d'autres organismes la mise en place de phénotypes contrôlés par quorum sensing. Ce mécanisme s'appelle le quorum quenching.

Par exemple, *B. subtilis* inhibe la production de l'antibiotique streptomycine chez *S. griseus* via la synthèse d'une lactonase. La production de cette enzyme est déclenchée en réponse à de la streptomycine dans le milieu. Cette lactonase est responsable de la dégradation de la molécule signal, une γ -butyrolactone, impliquée dans le mécanisme de quorum sensing contrôlant la synthèse de la streptomycine (Schneider et al. 2012). Ce dialogue moléculaire qui s'établit entre les deux organismes est appelé « effet ping-pong ».

L'une des hypothèses envisagées dans le cadre de l'interaction entre *S. ambofaciens* ATCC 23877 et *P. fluorescens* BBc6R8 est qu'un effet ping-pong se mettrait en place avec potentiellement l'implication d'un mécanisme de quorum quenching. La souche BBc6R8 serait capable de reconnaître un signal émis par *S. ambofaciens*, par exemple la kinamycine ou la molécule signal présentes en faible quantité en début d'interaction. Cela déclencherait alors la synthèse d'un facteur capable de dégrader cette molécule signal ou d'entrer en compétition avec son récepteur. Ceci aboutirait à l'inhibition du mécanisme de quorum sensing régulant la synthèse de kinamycine chez *S. ambofaciens* ATCC 23877.

Afin de tester si le facteur est une molécule volatile, des cocultures entre les deux organismes ont été réalisées sur milieu R2 gélosé en boîtes de Petri compartimentées parafilmées. Les résultats ont mis en évidence qu'il y avait toujours synthèse de kinamycine lorsque les deux microorganismes sont cultivés dans des compartiments séparés. Ainsi, l'impact de *P. fluorescens* BBc6r8 sur la molécule signal n'implique pas de facteur volatile.

L'autre hypothèse est que ce facteur pourrait être une molécule soluble. Afin de tester cette hypothèse, la réalisation de stries perpendiculaires entre les deux souches bactériennes a été effectuée sur milieu R2 gélosé. Les résultats montrent que plus la concentration de *S. ambofaciens* est faible, plus l'effet inhibiteur de *Pseudomonas* est prononcé (Figure 30). Des expériences similaires ont également révélé que pour une concentration définie de *S. ambofaciens* l'effet inhibiteur de *P. fluorescens* est distance dépendant. Ainsi la (ou les) molécule(s) impliquée(s) dans l'interaction serai(en)t soluble(s) et diffuserai(en)t dans le milieu gélosé. Le facteur intervenant entre les deux partenaires pourrait donc être une enzyme produite par la souche BBc6R8 capable de dégrader la molécule signal impliquée dans la synthèse de kinamycine ou alors une molécule capable d'entrer en compétition avec le récepteur de la molécule signal c'est-à-dire AlpZ.

Ce facteur soluble diffusible est-il constitutivement synthétisé ou sa production est-elle induite ? Afin de le savoir, différentes expériences ont été réalisées.

Du milieu R2 gélosé a au préalable été ensemencé par *P. fluorescens* BBc6R8, après 48h la strie a été retirée puis *S. ambofaciens* ATCC 23877 striée. Dans ce cas-là, *P. fluorescens* BBc6R8 n'empêche pas la pigmentation orangée d'apparaître ni même la bioactivité contre *B. subtilis*. De même, la culture de *S. ambofaciens* ATCC 23877 en présence d'un surnageant d'une culture liquide de *P. fluorescens* BBc6R8 en milieu R2 n'empêche pas ces phénotypes d'apparaître. Les mêmes résultats sont également observés lorsque la culture de *S. ambofaciens* est réalisée en présence de cellules autoclavées de *P. fluorescens*. Ces différentes expériences permettent ainsi de révéler que la synthèse du facteur serait induite et non pas constitutive chez *P. fluorescens* que ce soit une enzyme de dégradation ou une molécule de compétition. Ces données renforcent ainsi l'hypothèse de la mise en place d'un effet ping-pong entre les deux organismes.

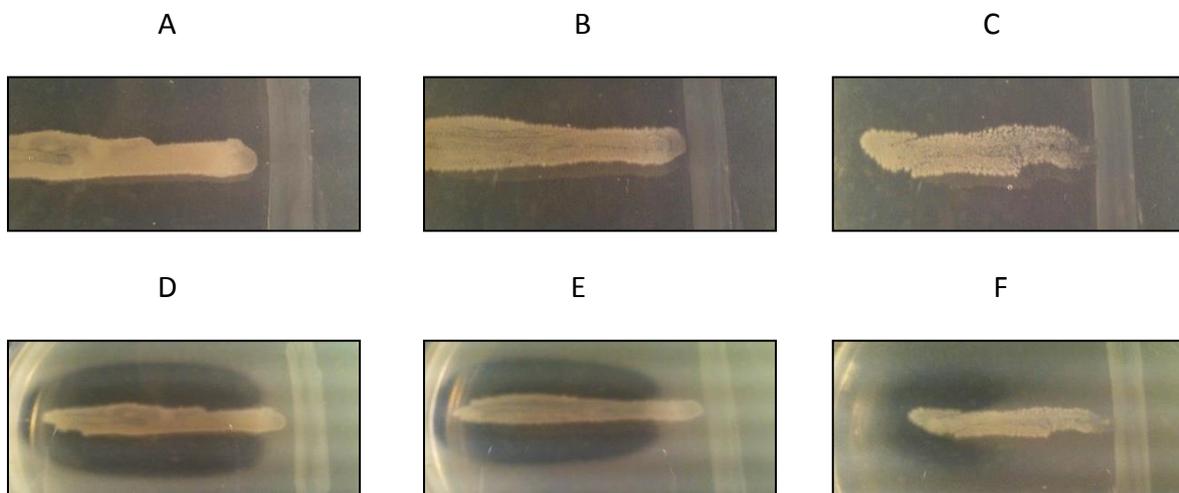


Figure 30 : Effet inhibiteur de *P. fluorescens* BBc6R8 sur la synthèse de kinamycine en fonction de la concentration de *S. ambofaciens* ATCC23877.

Stries à 90° sur milieu R2 gélosé de *P. fluorescens* à une concentration de 10^9 UFC/ml et *S. ambofaciens* à une concentration de 10^9 UFC/ml (A), 10^8 UFC/ml (B) et 10^7 UFC/ml (C). Incubation à 26,5°C pendant trois jours. Tests de bioactivité, réalisés avec la souche indicatrice *B. subtilis*, à partir des cocultures à 90° (D, E, F).

3.2.6. Quels sont les acteurs moléculaires impliqués dans l'interaction ?

Afin de déterminer les acteurs moléculaires impliqués dans l'interaction, des cocultures entre 4400 mutants aléatoires de *P. fluorescens* BBc6R8 (mutants obtenus par insertion du transposon Tn5) (Deveau, non publié) et *S. ambofaciens* ATCC 23877 ont été réalisées sur milieu R2 gélosé. Les résultats révèlent que neuf de ces mutants n'empêchent pas la production de kinamycine chez *S. ambofaciens*. En leur présence, il y a apparition du pigment orangé (Figure 31) et d'une zone de bioactivité contre *B. subtilis*.



Figure 31 : Analyse de l'apparition du pigment orangé chez *S. ambofaciens* en présence des mutants aléatoires de *P. fluorescens*. Coculture entre *S. ambofaciens* (à droite) et l'un des neuf mutants (à gauche) sur milieu gélosé R2. Incubation à 26,5°C pendant 3 jours.

Afin de déterminer le site d'intégration du transposon chez ces neuf mutants de *P. fluorescens* BBc6R8, des PCR nichées ont été réalisées et les produits de PCR ont été séquencés. Les résultats montrent que le transposon est toujours intégré, pour chacun de ces mutants, dans la phase codante d'un gène. Le tableau 3 récapitule l'ensemble des mutants sélectionnés, les gènes mutés et les fonctions putatives des protéines codées par ces gènes.

Tableau 3 : Mutants de la souche BBc6R8 n'influençant pas la synthèse de kinamycine chez *S. ambifaciens* ATCC 23877 , nom des mutants, noms des gènes mutés et fonctions putatives des protéines codées

Mutants	Nom du gène muté Numéro d'accension	Taille de la protéine en acides aminés	Fonction putative
P4C2	MHB_000099 ESW58963.1	250	Amidohydrolase
P4D1	MHB_004640 ESW54920.1	1283	système senseur du di-GMP cyclique
P33C8	MHB_004866 ESW55140.1	1031	Pompe à efflux de cations et d'antibiotiques
P4D2	MHB_001885 ESW57228.1	260	Composant d'un transporteur de type III/sécrétion (RhcJ protéine (T3SS incomplet)(Deng and Huang 1999)
P27A5	MHB_003500 ESW55631.1	599	Protéine de liaison au GTP, LepA Facteur de transcription
P4G3	MHB_000748 ESW58320.1	348	Peptide ABC transporteur de dipeptide/oligopeptide/système de transport du nickel, composant de perméase
P5H12	MHB_003752 ESW53503.1	386	Coenzyme PQQ
P5H9	MHB_006442 ESW52866.1	144	Régulateur transcriptionnel de la famille DksA/TraR (Perron et al. 2005)

27B9	MHB_004564 ESW55299.1	442	Enzyme de la famille tRNA-i(6)A37 thiotransferase, MiaB
------	--------------------------	-----	---

Un des gènes interrompus, MHB_000099, coderait une protéine pouvant s'apparenter à une amidohydrolase, famille d'enzyme impliquée dans des mécanismes de quorum quenching (Uroz et al. 2008). En effet, ces enzymes sont responsables de la dégradation de molécules signal (N-acyl homosérine lactone) impliquées dans des mécanismes de quorum sensing. Ce sont des hydrolases qui altèrent les liaisons amides. La nature de la molécule signal régulant la production de kinamycine n'est pas encore déterminée. Cependant comme expliqué au début de cette partie, les expériences montrent que ce n'est pas une γ -butyrolactone. Une des hypothèses actuelles est que cette molécule serait de la famille des furannes, or ces molécules ne présentent pas de liaison amide. Les avénolides, autres molécules signal produites par des *Streptomyces*, ne possèdent pas non plus de liaison amide. Ceci ouvre donc d'autres possibilités quant à la nature de la molécule signal. La correspondance entre la séquence de cette amidohydrolase et les bases de données est très faible, il est donc important de considérer ce résultat avec prudence pour le moment.

Un autre gène, MHB_004866, coderait une protéine qui présente un degré d'identité élevé avec un transporteur d'acriflavine impliqué dans la résistance à de nombreux antibiotiques. Ainsi, le "signal" perçut par BBc6R8 pourrait peut-être être la kinamycine. Dans l'interaction entre *B. subtilis* et *S. griseus*, c'est bien la streptomycine qui déclenche l'enzyme de quorum quenching chez *B. subtilis* (Schneider et al. 2012). Cependant, si l'on se réfère aux résultats d'expression obtenus par PCR quantitative présentés précédemment, le gène de biosynthèse *alpA* présente une expression très faible, proche du nul, en début de croissance. Il y aurait donc peu de chance pour que ce soit cette molécule, la molécule inductrice de *P. fluorescens* BBc6R8.

Une autre protéine, codée par le gène MHB_004640, appartiendrait au système senseur du di-GMP cyclique, système majeur de transduction du signal chez les Gram négatives. Ce système est surtout décrit comme un élément clé de la régulation de la mobilité et de la formation des biofilms, mais de plus en plus d'études l'associent à d'autres fonctions (Römling 2012). Ce système pourrait donc être impliqué dans la transduction du signal chez BBc6R8. Une autre protéine codé par le gène MHB_001885 est l'homologue de HrcJ, protéine de la seringue du système de sécrétion de type 3 (T3SS). Elle est très proche du T3SS accessoire de *P. syringae* et probablement acquis par BBc6R8 par transfert horizontal. La fonction de ce T3SS accessoire est une énigme chez les autres bactéries ; s'il est impliqué dans l'interaction avec une bactérie, ce serait un rôle novateur.

Deux autres gènes coderaient des protéines dont la fonction putative est en lien avec l'acquisition d'éléments azotés. Un des deux gènes, MHB_003500, coderait un facteur de transcription potentiellement en opéron avec les gènes *cbrA* et *cbrB* qui codent un système

de régulation à deux composants probablement impliqué dans la régulation de l'acquisition d'éléments azotés (Nishijyo et al. 2001). L'autre serait un transporteur ABC, codé par le gène MHB_000748, annoté par homologie de séquence comme transporteur de peptides/opine, en lien avec le métabolisme des acides aminés.

Le gène MHB_006442 coderait un régulateur transcriptionnel de la famille DksA/TraR. Chez *P. aeruginosa*, DksA en synergie avec le ppGpp augmenterait la liaison de l'ARN polymerase aux promoteurs ribosomiques. DksA serait un nouveau régulateur de la transcription des ARNr chez cette bactérie. Cependant des études réalisées chez *P. aeruginosa* montrent que ce régulateur serait également impliqué dans l'inhibition de ses propres systèmes de Quorum Sensing (Branny et al. 2001; Jude et al. 2003).

Le gène MHB_003752 serait impliqué dans la synthèse du cofacteur PQQ. Les *Pseudomonas* sont connus pour acidifier le milieu grâce à la production d'acide gluconique via l'action d'enzymes glucose déshydrogenases couplées à ce cofacteur redox PQQ (Eisenberg et al. 1974). Ce facteur serait également impliqué dans la régulation de la production d'antibiotique, ceci a été démontré chez *P. fluorescens* CHAO par exemple (de Werra et al. 2009). Ainsi, il intervient par exemple dans la régulation de la production d'un métabolite secondaire responsable du quorum quenching.

Enfin, le gène MHB_004564 serait impliqué dans la synthèse d'une ARNt-i(6)A37 méthylthiotransférase. Cette famille d'enzymes catalyse la méthylthiolation du N6-(diméthylallyl)adenosine, aboutissant à la formation du 2-méthylthio-N6-(diméthylallyl)adenosine à la position 37 des ARNt qui commencent la lecture des codons avec l'uridine. Elles sont impliquées dans la thiolation et la méthylation des ARNt (Pierrel et al. 2003; Pierrel et al. 2004).

Pour le moment, il est difficile d'attribuer des rôles putatifs à certaines de ces protéines au sein de l'interaction entre *S. ambofaciens* ATCC 23877 et *P. fluorescens* BBc6R8.

Afin de progresser dans « le décryptage » de l'interaction et l'action des acteurs moléculaires, l'expression de ces 9 gènes au cours de l'interaction a été analysée par PCR quantitative en temps réel. Il est possible d'imaginer qu'il y aurait un ordre d'action de ces acteurs moléculaires, telle une cascade. Ou alors, l'effet de la mutation de ces gènes peut être totalement indépendante du rôle des autres gènes. À partir de cultures de *P. fluorescens* BBc6R8 et des cocultures entre *P. fluorescens* BBc6R8 et *S. ambofaciens* ATCC 23877 sur milieu gélosé R2, des ARN ont été extraits au cours du temps. L'expression des différents gènes a ensuite été analysée. L'expression de certains d'entre eux montre une induction en présence de *S. ambofaciens*. C'est le cas, par exemple, pour le gène codant le transporteur d'antibiotiques, MHB_004866 (Figure 32 A). Quant aux autres, comme le gène intervenant dans le système senseur du di-GMPc, MHB_004640, (Figure 32 B), leur expression est élevée dès le premier point d'analyse que *Pseudomonas* soit en interaction ou pas avec *S. ambofaciens* ATCC 23877, il semble donc nécessaire d'analyser leur expression à

des points plus précoces afin de déterminer s'il y a une différence du profil d'expression entre les deux conditions (*Pseudomonas* seule ou en coculture).

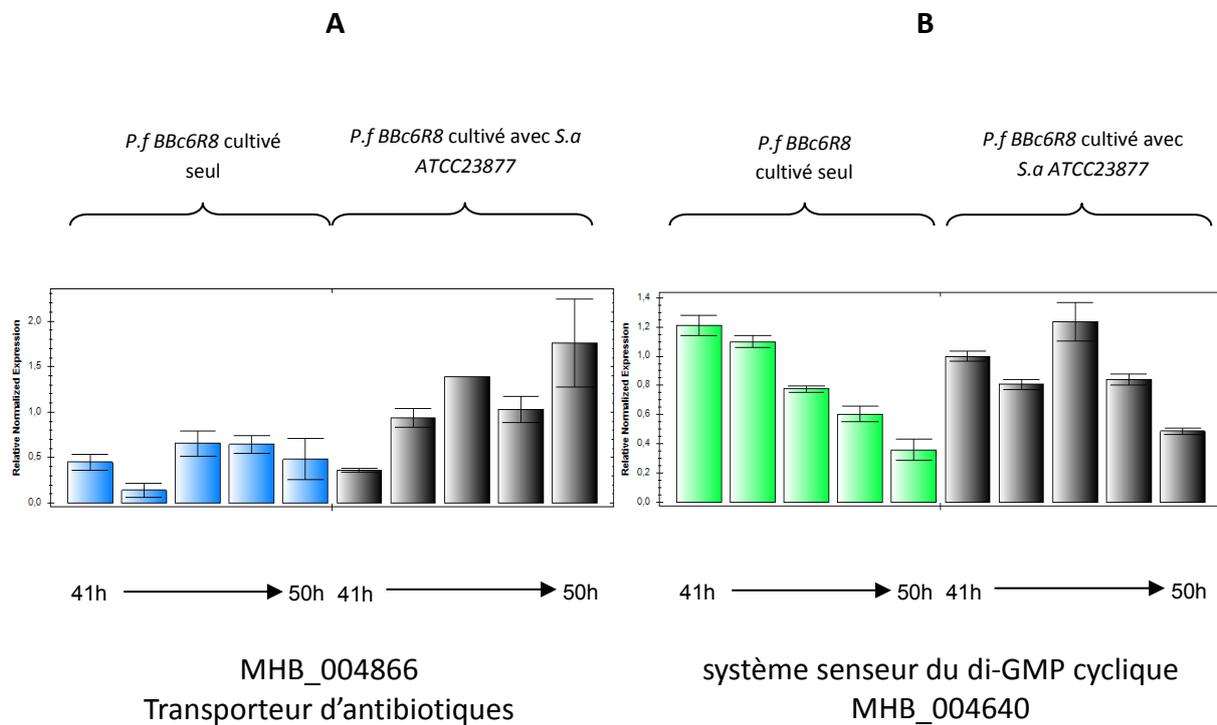


Figure 32 : Expression des gènes de *P. fluorescens* BBc6R8 impliqués dans l'interaction entre *S. ambofaciens* ATCC23877 et *P. fluorescens* BBc6R8 sur milieu R2. Les résultats présentent l'expression de deux des neuf gènes : celui qui serait impliqué dans la synthèse d'un transporteur d'antibiotique, MHB_004866, (A) et celui qui serait impliqué dans la synthèse d'un composant du système senseur du di-GMP cyclique, MHB_004640 (B). L'expression est étudiée lorsque *P. fluorescens* est cultivé seul ou en présence de *S. ambofaciens*. Les extractions d'ARN ont été réalisées à 41, 44,5, 46,5, 48, et 50 h de croissance à 26,5°C. Analyse réalisée par qPCR.

En ce qui concerne le gène codant l'amidohydrolase putative, MHB_000099, les premières données semblent intéressantes puisque les résultats de qPCR montrent que l'expression de ce gène serait induite en présence de *S. ambofaciens* dès 30h de culture (Figure 33).

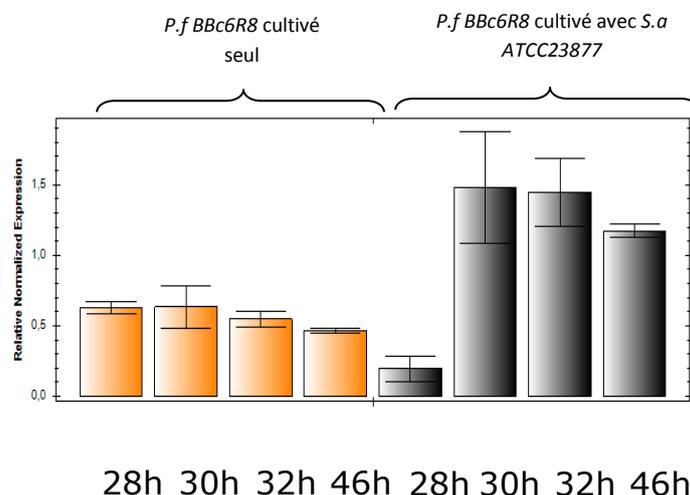


Figure 33 : Expression du gène MHB_000099, impliqué dans la synthèse de l'amidohydrolase putative chez *P. fluorescens*. L'expression est étudiée lorsque *P. fluorescens* est cultivé seul ou en présence de *S. ambofaciens*. Les extractions ARN ont été réalisées entre 28h et 46h de croissance à 26,5°C sur milieu R2. Analyse réalisée par qPCR.

Afin de déterminer l'implication d'autres acteurs moléculaires au sein de cette interaction, des cocultures entre *S. ambofaciens* ATCC 23877 et différents mutants d'une autre souche, *P. protegens* Pf-5, ont été réalisées. *P. protegens* Pf-5 (autrefois appelée *Pseudomonas fluorescens* Pf-5; Ramette *et al.*, 2011) colonise les surfaces de graines et de racines de plantes. Elle protège ces plantes d'infections fongiques ou bactériennes (Kraus and Loper 1992; Rodriguez and Pfender 1997; Sharifi-Tehrani *et al.* 1998) grâce aux différents métabolites secondaires qu'elle produit (Gross *et al.* 2007; Loper *et al.* 2008).

P. protegens Pf-5 est une souche un peu différente de BBc6R8; elle n'appartient pas au même sous-clade mais possède les mêmes sidérophores et partage 75% de son génome avec la souche BBc6R8 donc les gènes « essentiels » (core genome) sont partagés. Comme la banque de mutants de la souche BBc6R8 n'est pas saturante, tous les mutants ne sont pas présents, nous avons donc émis l'hypothèse que screener certains mutants de Pf-5 pourrait nous permettre d'identifier les gènes primordiaux régulant l'interaction entre *P. fluorescens* BBc6R8 et *S. ambofaciens* ATCC 23877.

La plupart des antibiotiques produits par *P. fluorescens* Pf-5 sont sous la dépendance des régulateurs centraux GacA, RpoS et PtsP et de la protéase Lon. Les mutants choisis pour réaliser les cocultures avec *S. ambofaciens* ATCC 23877 sur milieu R2 gélosé ont donc été ceux ne produisant plus le régulateur global GacA ou RpoS ou PtsP ou la protéase Lon (J. Loper, communication personnelle).

Le système Gac (Global activator) est un système de transduction à deux composants composé de la kinase senseur GacS et du régulateur réponse GacA. Ce système est hautement conservé chez *Pseudomonas* spp. Chez *P. protegens* Pf-5, ce système régule la production de métabolites secondaires (Laville *et al.* 1992; Corbell and Loper 1995), la

réponse au stress oxydant (Whistler et al. 1998) et la motilité cellulaire (Goodier and Ahmer 2001) (Ramette et al. 2011).

Le facteur sigma σ^S codé par *rpoS* est un régulateur central de l'expression de gènes de cellules en phase stationnaire (Kolter et al. 1993). Chez *P. protegens* Pf-5, ce facteur sigma influence la production d'antibiotiques et la réponse aux stress osmotique, oxydatif (Sarniguet et al. 1995) ou même thermique (Stockwell and Loper 2005).

La protéase à sérine Lon et le régulateur PtsP influencent également la production de métabolites secondaires et la réponse aux stress chez *P. protegens* Pf-5 (Whistler et al. 2000; Loper et al. 2008).

Ces différents régulateurs sont donc requis pour une survie optimale de *P. protegens* Pf-5 à la surface de plantes puisque de nombreux stress y sont rencontrés.

Les résultats ont révélé que les gènes mis en jeu dans l'interaction entre *P. fluorescens* BBc6R8 et *S. ambofaciens* ATCC 23877 ne font pas partis des régulons de ces régulateurs centraux. Ainsi ces régulateurs n'interviennent pas dans l'interaction mise en évidence. En effet, l'inhibition de la production de kinamycine par *S. ambofaciens* ATCC 23877 a toujours lieu en présence des mutants de la souche Pf-5 analysés.

Pour conclure, notre hypothèse principale est qu'un dialogue moléculaire se mettrait en place entre les deux organismes, qu'il y aurait un phénomène d'effet ping-pong. Ce dialogue aboutirait à la répression de production de kinamycine par *S. ambofaciens* ATCC 23877. L'une des autres hypothèses abordées au cours de ce travail est qu'un mécanisme de quorum quenching pourrait peut-être être impliqué dans ce dialogue. En effet, au cours de la croissance, une molécule produite par *S. ambofaciens* ATCC23877, peut être la molécule signal ou la kinamycine ou une molécule indéterminée, serait détectée par *P. fluorescens* BBc6R8. Ceci induirait alors la synthèse d'une enzyme de dégradation qui pourrait peut-être être la protéine de type amidohydrolase ou une molécule de compétition capable de se fixer à AlpZ. Dans les deux cas, il y aurait absence d'induction ou trop faible du mécanisme de quorum sensing régulant la production de la kinamycine chez *S. ambofaciens*, ce qui expliquerait l'absence de production de l'antibiotique.

3.2.7. Étude de la spécificité de l'interaction

Afin d'analyser si cet effet est spécifique de la souche BBc6R8, des cocultures entre *S. ambofaciens* et *P. fluorescens* Pf0-1, *P. fluorescens* Pf-5, *P. fluorescens* Sbw25 et *P. aeruginosa* PAO1 ont été réalisées sur milieu R2 gélosé. Les résultats montrent que ces souches inhibent aussi la synthèse de kinamycine (Figure 34). L'analyse de leur génome révèle qu'elles codent toutes des protéines fortement apparentées aux 9 protéines mises en évidence précédemment. A contrario, d'autres genres bactériens tels que *Collimonas* PMB3(1) ou *Burkholderia glathei* PML1 (12) n'ont pas d'effet sur la production de kinamycine.

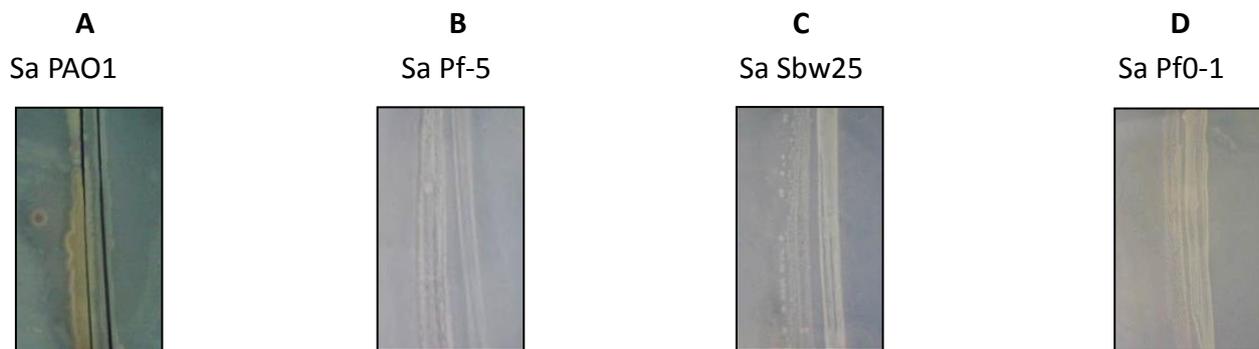
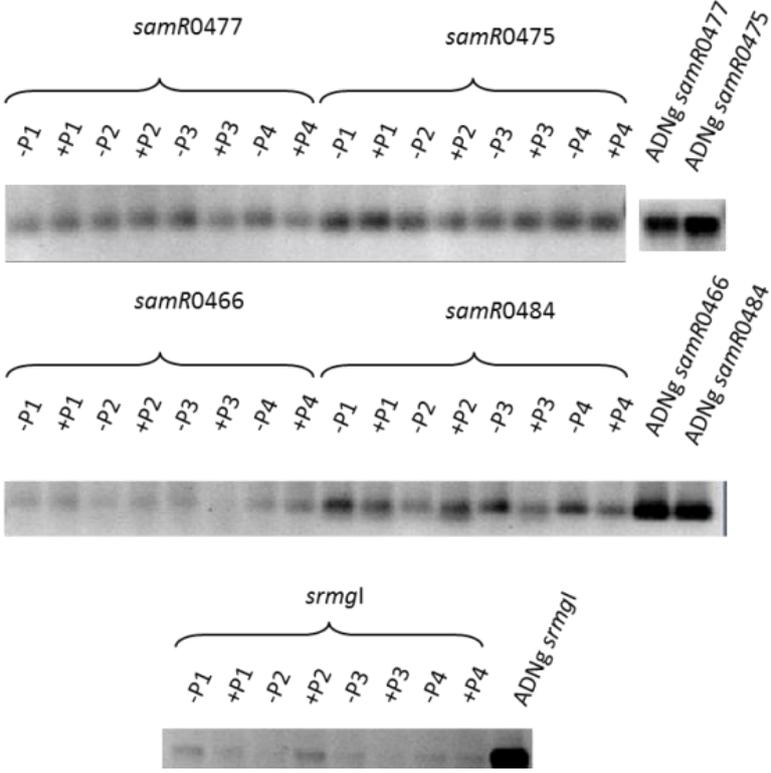
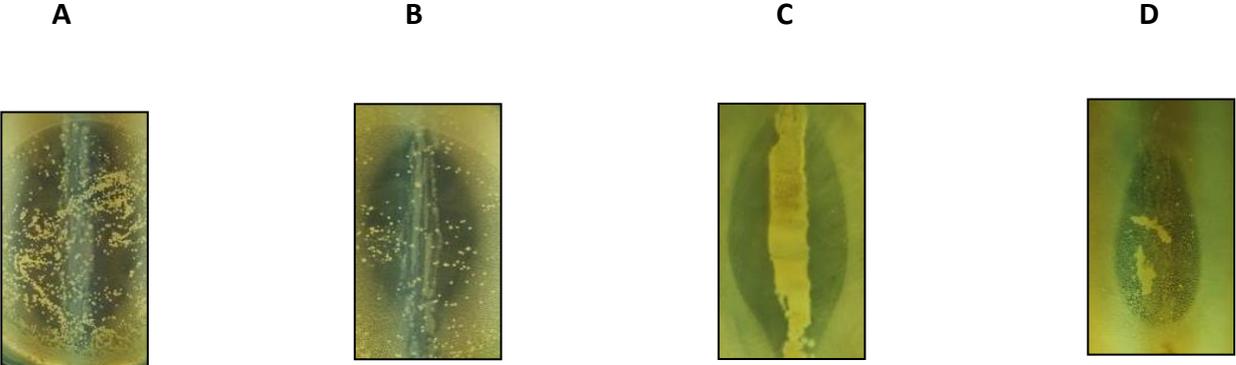


Figure 34 : Effet de différentes souches de *Pseudomonas* sur la production de l'antibiotique kinamycine sur milieu R2. Tests de bioactivité, réalisés avec la bactérie indicatrice *B. subtilis*, à partir des cultures de la souche de *S. ambofaciens* (Sa) cultivée avec *P. aeruginosa* PAO1 (PAO1) (A), *P. fluorescens* Pf-5 (Pf-5) (B), *P. fluorescens* Sbw25 (Sbw25) (C) et *P. fluorescens* Pf0-1 (Pf0-1) (D).

Enfin, nous avons analysé si *P. fluorescens* BBc6R8 était également capable d'influencer la production d'autres antibiotiques connus chez *S. ambofaciens* ATCC 23877. Des cocultures entre les deux espèces ont donc été réalisées sur milieu R2, milieu sur lequel la stambomycine est également produite et sur milieu MP5, milieu de production de la spiramycine et congocidine. La kinamycine a une très faible activité contre *M. luteus* contrairement à la stambomycine. La production de kinamycine sur milieu R2 n'impacte donc pas les résultats des tests de bioactivité réalisés avec *M. luteus* pour la détection de stambomycine. Les tests de bioactivité ont révélé que la synthèse de ces trois antibiotiques ne semble pas être affectée par la présence de *P. fluorescens* BBc6R8 (Figure 35 A, B, C et D). Pour confirmer cette hypothèse, l'analyse de l'expression des gènes de biosynthèse, de régulation et de résistance à ces antibiotiques a été réalisée. Les ARN ont été extraits à partir de ces cultures au cours du temps et l'expression des différents gènes a ensuite été analysée par PCR quantitative en temps réel. Les résultats ont permis de confirmer que l'expression des gènes n'est pas modifiée en présence de *P. fluorescens* BBc6R8 (Figure 38 E). Il est donc

raisonnable de penser que la production de ces trois antibiotiques n'est pas affectée par la souche BBc6R8.



E

E

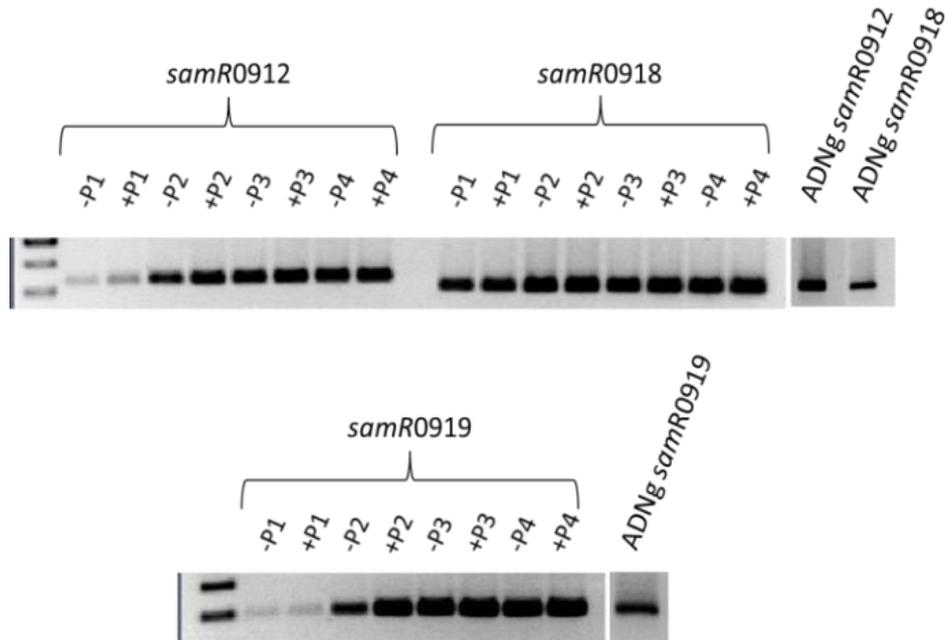


Figure 35 : Analyse de l'effet de *P. fluorescens* BBc6R8 sur la synthèse d'autres antibiotiques produits par *S. ambofaciens*.

Tests de bioactivité, réalisés avec la bactérie indicatrice *M. luteus* (A et B), *E. coli* (C et D), à partir des cultures de la souche de *S. ambofaciens* cultivée seule (A) ou avec *P. fluorescens* BBc6R8 (B) sur milieu R2, milieu de production de la stambomycine et des cultures de la souche de *S. ambofaciens* cultivée seule (C) ou avec *P. fluorescens* BBc6R8 (D) sur milieu MP5, milieu de production de la spiramycine et congocidine.

(E) Analyse de l'expression par RT-PCR des gènes impliqués dans la régulation (*samR0466*, *samR0484*) et la synthèse de stambomycine (*samR0475*, *samR0477*), la synthèse de spiramycine (*srmgl*), la régulation (*samR0918*), synthèse (*samR0912*) et résistance (*samR0919*) à la congocidine chez *S. ambofaciens* cultivée seule (*-P*) ou en présence de *P. fluorescens* BBc6R8 (*+P*). Les nombres 1, 2, 3 et 4 correspondent respectivement aux temps de culture suivants : 46,5h, 52,5h, 72h et 75,5h.

3.3. Discussion

Le criblage a donc mis en évidence une interaction entre les deux habitants du sol, *S. ambofaciens* ATCC 23877 et *P. fluorescens* BBc6R8. Au cours de cette interaction, *P. fluorescens* BBc6R8 détecterait la présence de *Streptomyces* soit par l'intermédiaire de la molécule signal impliquée dans le déclenchement de la synthèse de kinamycine, soit par la kinamycine soit par une autre molécule. Ceci induirait alors la production d'un facteur de quorum quenching par *P. fluorescens* BBc6R8. Ce facteur dégraderait alors la molécule signal

ou entrerait en compétition avec son récepteur AlpZ. La cascade de QS chez *S. ambofaciens* ATCC 23877 ne serait donc pas assez fortement induite pour pouvoir enclencher la production de kinamycine.

Le système de boucle de régulation positive, via la molécule signal, qui activerait la synthèse de kinamycine permettrait au sein de l'environnement complexe qu'est le sol d'enclencher la synthèse d'antibiotiques par les membres de la colonie voire des colonies proches afin de répondre plus rapidement aux stress externes. La synthèse d'antibiotiques pourrait ainsi permettre aux bactéries de lutter contre d'éventuels prédateurs ou compétiteurs. Cependant, en plus de présenter un rôle antagoniste envers d'autres organismes (arrêt de la croissance ou destruction), les antibiotiques auraient également un rôle de molécule signal (Davies, 2006). Ainsi, les organismes producteurs permettraient aux organismes non producteurs de coloniser des surfaces (mobilité, formation de biofilms) ou de lutter contre des prédateurs de type protistes (cytotoxicité). Le système d'auto-induction pourrait donc conférer un avantage adaptatif au *Streptomyces*, il permettrait à la fois d'induire un système de défense collectif et de réguler l'homéostasie des communautés bactériennes via la production d'antibiotiques.

D'après nos résultats, *P. fluorescens* BBc6R8 pourrait donc empêcher la mise en place de ce système d'auto-induction. Il inhiberait donc la mise en place du système de défense collectif de *S. ambofaciens* ATCC 23877 ainsi que leur système de communication. Il s'agirait donc d'une stratégie de compétition doublement efficace au sein d'un environnement aussi concurrentiel que le sol.

Une discussion plus détaillée sera présentée dans la partie Discussion de ce manuscrit.

4. Inhibition de la synthèse de γ -actinorhodine chez *S. coelicolor* A3(2) par *P. fluorescens* BBc6R8

Au cours de l'étude de criblage, nous avons mis en évidence l'effet de *P. fluorescens* BBc6R8 sur la synthèse de l'antibiotique kinamycine chez *S. ambofaciens* ATCC 23877. Cependant *P. fluorescens* BBc6R8 ne semble pas affecter la synthèse des autres antibiotiques tels que la spiramycine, la congocidine ou la stambomycine. Il est important de préciser que leur synthèse n'implique pas de mécanisme de QS, en tout cas aucun mécanisme de ce type n'a jamais été mis en évidence. Par la suite, nous avons voulu analyser l'effet de *P. fluorescens* BBc6R8 sur la production d'autres antibiotiques dont la synthèse est régulée par des molécules signal. C'est pourquoi, nous nous sommes intéressés aux antibiotiques pigmentés actinorhodine et undécylprodigiosine produits *S. coelicolor* A3(2), une autre souche modèle du laboratoire. La production de ces antibiotiques est régulée par un mécanisme de quorum sensing impliquant la molécule signal SCB1 (Takano et al. 2001). L'hypothèse première étant que *P. fluorescens* BBc6R8 pourrait également impacter la synthèse de ces molécules via un mécanisme de quorum quenching. L'ensemble des résultats obtenus est décrit dans l'article « Gluconic acid-producing *Pseudomonas* sp. prevent γ -actinorhodin biosynthesis by *Streptomyces coelicolor* A3(2) » (Galet et al. 2014) publié dans le journal Archives of Microbiology. Ces résultats seront donc présentés sous forme de résumé.

4.1. Introduction

4.1.1. *S. coelicolor* A3(2)

S. coelicolor A3(2) est l'une des bactéries modèles les plus étudiées (Hopwood 1999). La parution de sa séquence génomique (Bentley et al. 2002) a permis d'étendre les connaissances sur cet organisme ainsi que l'analyse à grande échelle de son transcriptome (Huang et al. 2001; Bucca et al. 2003) et de son protéome (Hesketh et al. 2002; Novotna et al. 2003). La souche utilisée dans le cadre de la thèse, *S. coelicolor* M145, est un dérivé prototrophe de la souche A3(2) à qui il manque les deux plasmides, SCP1, plasmide linéaire de 365 kb et SCP2, plasmide circulaire de 31 kb. Elle présente un chromosome linéaire de 8,667,507 pb avec un pourcentage en bases G et C d'environ 72 %. *S. coelicolor* est connue pour synthétiser une variété de métabolites secondaires (Hopwood et al. 1995; Bentley et al. 2002) dont notamment les antibiotiques pigmentés actinorhodine et undécylprodigiosine. Elle produit aussi l'antibiotique dépendant du calcium CDA. L'actinorhodine appartient à la classe des polyketides aromatiques, antibiotiques benzoisochromanequinone (BIQ). C'est le premier antibiotique dont le cluster a été cloné en entier et a servi comme modèle pour étudier les PKS de type II. *S. coelicolor* produit l'undécylprodigiosine, antibiotique de la famille des prodiginines, ainsi qu'un dérivé cyclique, la streptorubine B. Les prodiginines sont une famille d'antibiotiques pigmentés rouge, linéaire et cyclique de type oligopyrrole qui est produite notamment par les Actinomycètes. Les membres de cette classe d'antibiotiques sont connus pour leur activité antifongique, antibactérienne, anticancéreuse et d'immunosuppresseur. La synthèse de ces antibiotiques est régulée par un mécanisme

complexe de quorum sensing faisant intervenir la γ -butyrolactone SCB1, les activateurs transcriptionnels ActII-ORF4 et RedD (Takano et al. 1992; Gramajo et al. 1993).

Le génome de *S. coelicolor* A3(2) a révélé de manière inattendue un fort potentiel de synthèse de métabolites secondaires. Alors que seulement cinq métabolites ont été identifiés en cinquante ans par des approches de criblage classique, l'analyse de son génome a révélé sa capacité à produire 20 produits naturels supplémentaires. Depuis, de nombreux composés ont été caractérisés comme le tétrapeptide chélateur de fer coelicheline, le nouveau polyketide alcaloïde coelimycine P1 ou des lipides complexe incluant les hopanoïdes.

4.1.2. Synthèse d'actinorhodine et de γ -actinorhodine chez *S. coelicolor* A3(2)

Bien que l'undécylprodigiosine soit un antibiotique rouge, l'actinorhodine, essentiellement intracellulaire, fournit également une coloration rouge aux cellules. Cette coloration rouge peut tourner bleue en environnement basique. L'actinorhodine est un indicateur de pH. Les gènes *act* sont groupés en cinq régions (Figure 36).

L'actinorhodine peut être convertie en γ -actinorhodine pendant ou après l'export de la cellule. La γ -actinorhodine est produit au niveau intracellulaire ainsi que extracellulaire, c'est la forme lactone de l'actinorhodine qui est un pigment bleu diffusible (Bystrykh et al. 1996). La production de γ -actinorhodine dépend du pH (Bystrykh et al. 1996). La bactérie produit l'actinorhodine dans des conditions acides (pH 4,5 à 5,5) alors que la γ -actinorhodine est produite à un pH élevé (6,0 à 7,5). En fait, la production de γ -actinorhodine dépend du transporteur ActII-ORF3, qui est probablement impliqué dans la synthèse et l'exportation de ce dérivé lactonique (Bystrykh et al. 1996). Le mécanisme par lequel le pH influe sur la production de γ -actinorhodine est, à notre connaissance, encore inconnue.

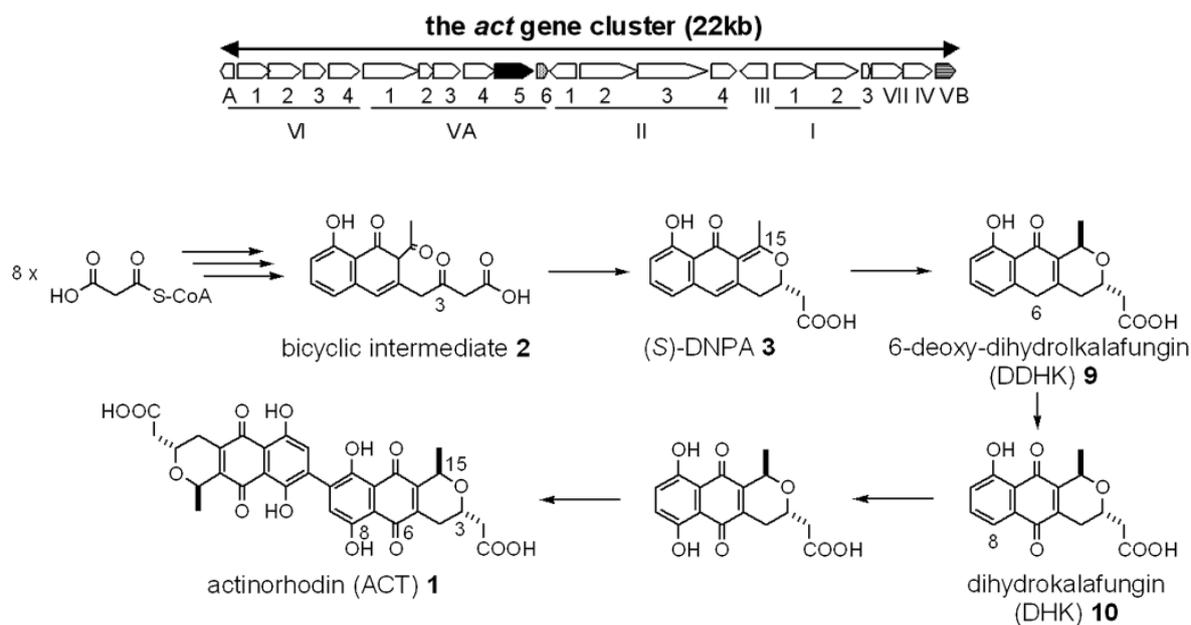


Figure 36 : Cluster de gènes responsable de la synthèse d'actinorhodine et étapes de la biosynthèse de l'actinorhodine. (Okamoto et al. 2009)

4.2. Résumé des résultats

Afin de déterminer l'impact de *P. fluorescens* BBc6R8 sur la synthèse d'actinorhodine et d'undécylprodigiosine chez *S. coelicolor* A3(2), des cocultures entre les deux espèces bactériennes ont été réalisées sur milieu gélosé R2, milieu sur lequel les deux antibiotiques sont produits.

4.2.1. *P. fluorescens* BBc6R8 inhibe la production de γ -actinorhodine chez *S. coelicolor* M145

Lorsque *S. coelicolor* A3(2) est cultivée seule sur milieu R2, elle forme des colonies bleues et un pigment bleu diffuse également autour des colonies. En revanche, lorsque *S. coelicolor* A3(2) est cocultivée avec *P. fluorescens* BBc6R8, les colonies restent rouges et perdent leur capacité à sécréter le pigment bleu. Comme décrit dans l'introduction, *S. coelicolor* produit l'antibiotique rouge undécylprodigiosine ainsi que l'actinorhodine qui est une molécule présente exclusivement de manière intracellulaire et qui donne une coloration rouge aux cellules jusqu'à pH 7,5. Au-delà elle prend une pigmentation bleue. Pendant ou après son export de la cellule, aux alentours de pH 6, cet antibiotique peut être converti sous sa forme lactone, la γ -actinorhodine, un pigment bleu diffusible (Bystrykh et al. 1996). La coloration bleue des colonies de *S. coelicolor* sur milieu R2 correspond donc à la production de ce pigment (Bystrykh et al. 1996). D'après les observations effectuées à partir des cocultures bactériennes, nous avons émis l'hypothèse que *P. fluorescens* BBc6R8 empêcherait la production de l'antibiotique γ -actinorhodine chez *S. coelicolor* A3(2). Pour tester cette

hypothèse, la production de ce pigment a été analysée en présence de la souche BBc6R8 chez des mutants de *S. coelicolor* A3(2) incapables de synthétiser soit l'undécylprodigiosine (souche M510) soit l'actinorhodine (souche M511) (Floriano and Bibb 1996). La souche M511 produit une couleur rouge en absence et en présence de *P. fluorescens* BBc6R8, ce qui indique que *P. fluorescens* BBc6R8 ne modifie pas la production d'undécylprodigiosine sur le milieu R2. En revanche, le mutant M510 présente une pigmentation rouge en présence de la souche BBc6R8 tandis qu'il présente une pigmentation bleue qui diffuse, lorsqu'il est cultivé seul. Ces données suggèrent donc que *P. fluorescens* BBc6R8 empêche spécifiquement la production de γ -actinorhodine par la souche sauvage M145 et mutante M510 sur le milieu R2. Il est important de noter que l'expression du cluster de gènes responsable de la biosynthèse d'actinorhodine ne semble pas affectée puisque *S. coelicolor* M510 produit toujours la forme intracellulaire de l'actinorhodine en présence de la souche BBc6R8. En effet, en présence de vapeurs d'hydroxyde d'ammonium (création d'un environnement basique) la pigmentation rouge intracellulaire de la souche M510 vire au bleue, ce qui témoigne de la présence de cet antibiotique. Cependant, des analyses transcriptionnelles des gènes impliqués dans la synthèse d'actinorhodine ainsi que le dosage de l'antibiotique permettraient de déterminer si *P. fluorescens* BBc6R8 n'a réellement pas d'impact sur la synthèse d'actinorhodine.

4.2.2. L'acidification du milieu par *P. fluorescens* BBc6R8 par la production d'acide gluconique inhibe la synthèse de γ -actinorhodine chez *S. coelicolor*

Comme expliqué précédemment, la production de γ -actinorhodine par *S. coelicolor* A3(2) dépend du pH (Bystrykh et al. 1996). Au cours de nos travaux, nous avons démontré que l'effet de *P. fluorescens* BBc6R8 sur la biosynthèse de γ -actinorhodine est le résultat de l'acidification du milieu de culture. En effet, le pH du milieu R2 liquide inoculé avec la souche BBc6R8 diminue à 3,1, alors qu'il est resté stable à 7,2 dans le milieu R2 non inoculé. *P. fluorescens* BBc6R8 induit également un changement de couleurs, du violet au jaune, de l'indicateur de pH, le pourpre de bromocrésol, lors de cultures sur milieu R2 solide. Ceci est le signe d'un pH inférieur à 5,2. Cependant, lorsque le milieu est tamponné avec 100 mM de TES, la souche de BBc6R8 est incapable d'acidifier le milieu et n'empêche alors plus la production de γ -actinorhodine par *S. coelicolor* M510.

Dans le cadre de l'interaction entre *S. ambofaciens* ATCC 23877 et *P. fluorescens* BBc6R8, neuf mutants de la souche BBc6R8 ont été mis en évidence comme n'ayant pas d'impact sur la production de kinamycine, contrairement à la souche sauvage. Ainsi, neuf acteurs moléculaires hypothétiques seraient impliqués dans le dialogue mis en place entre les deux bactéries. Même si le mécanisme impliqué dans l'interaction avec *S. coelicolor* M145 est différent du mécanisme impliqué dans l'interaction avec *S. ambofaciens* ATCC 23877, nous avons voulu déterminer si certains de ces acteurs étaient tout de même communs. Pour ce faire, des cocultures ont été réalisées entre ces souches sur milieu R2 gélosé. Parmi ces neuf

mutants, il y en a un qui ne modifie pas la synthèse de γ -actinorhodine chez *S. coelicolor*. Il s'agit du mutant P5H12, dont le gène *pqqE* de l'opéron *pQQFABCDE* est interrompu par le transposon Tn5. Les *Pseudomonas* sont connus pour acidifier le milieu extérieur grâce à la production d'acide gluconique à partir de l'oxydation du glucose extracellulaire par l'intermédiaire à la fois de l'apo-glucose déshydrogénase et de son cofacteur redox PQQ (Eisenberg et al. 1974). L'opéron *pQQFABCDE* contrôle la synthèse d'acide gluconique, cependant la fonction de PqqE est encore inconnue (Gliese et al. 2010). Malgré tout, cette enzyme jouerait un rôle important dans la production d'acide gluconique puisqu'un mutant *pqqE* de *Pseudomonas fluorescens* F113 ne produit qu'une très faible quantité de cet acide (Miller et al. 2010). Un dosage et un suivi du pH à partir de cultures liquides révèlent que le mutant P5H12 ne produit plus d'acide gluconique et n'acidifie plus le milieu de culture, contrairement à la souche sauvage. La complémentation de la souche P5H12 avec l'allèle sauvage *pqq* restaure le phénotype observé chez la souche BBc6R8. Lorsque du mannitol est utilisé comme source de carbone à la place du glucose, la souche sauvage BBc6R8 est incapable de réduire le pH extracellulaire dû à l'absence de production d'acide gluconique. Ces données indiquent que l'acide gluconique est le principal acide organique produit par la souche BBc6R8 lorsqu'elle est cultivée sur le milieu R2 et que cet acide est le principal responsable de l'acidification du milieu extracellulaire.

4.2.3. L'inhibition de la γ -actinorhodine chez *S. coelicolor* est un phénomène répandu parmi d'autres *Pseudomonas fluorescens* et *P. aeruginosa*

La réalisation de cocultures entre une banque de 60 souches de *Pseudomonas fluorescens* ainsi que *P. fluorescens* Pf0-1, Pf-5, Sbw25, *P. aeruginosa* PAO1 et *S. coelicolor* M510 révèlent que l'ensemble de ces souches inhibent la production de γ -actinorhodine chez *S. coelicolor*. De plus, elles entraînent toutes une modification de la couleur du pourpre de bromocrésol, preuve qu'elles acidifient le milieu de culture.

L'analyse du génome des souches *P. fluorescens* pf0-1, pf-5, Sbw25, *P. aeruginosa* PAO1 révèlent la présence de l'opéron *pQQFABCDE*. Par conséquent, c'est la biosynthèse de l'acide gluconique, et probablement de son dérivé, l'acide 2-cétogluconique, produits par les différentes espèces de *Pseudomonas*, qui est responsable de l'inhibition de la production de γ -actinorhodine chez *S. coelicolor* A3(2). Il est important de noter que la diminution du pH n'empêche pas l'expression du cluster de gènes responsable de la biosynthèse d'actinorhodine puisque *S. coelicolor* M145 produit toujours la forme intracellulaire de l'actinorhodine en présence des protéobactéries. L'acidification agirait donc plutôt au moment de l'export de l'actinorhodine, étape au cours de laquelle elle se transformerait en γ -actinorhodine.

4.3. Discussion

Cette étude met en évidence pour la première fois une interaction entre les bactéries du sol *Pseudomonas* et *Streptomyces*. Elle démontre que des *Pseudomonas* fluorescents ainsi que l'agent pathogène opportuniste *P. aeruginosa* PAO1 sont capables d'influencer le métabolisme secondaire de *S. coelicolor* A3(2). En effet, ces protéobactéries empêchent la production du pigment diffusible γ -actinorhodine chez *S. coelicolor* via l'acidification du milieu de culture par l'acide gluconique.

Des points de discussion sont abordés ci-après, cependant une discussion plus générale des résultats sera détaillée dans la partie Discussion de ce manuscrit de thèse.

L'hypothèse initiale était que *P. fluorescens* Bbc6R8 pourrait influencer la synthèse des antibiotiques actinorhodine et undécylprodigiosine via un mécanisme similaire à celui observé lors de l'interaction avec *S. ambofaciens* ATCC 23877. En effet, tout comme la synthèse de kinamycine, la synthèse de ces deux antibiotiques est également contrôlée par un mécanisme de QS impliquant la molécule signal SCB1. Les résultats ont montré que *P. fluorescens* Bbc6R8 n'a pas d'effet sur la synthèse d'actinorhodine ni sur celle de l'undécylprodigiosine. Les résultats obtenus au cours de la thèse ont cependant mis en évidence un effet inhibiteur de *Pseudomonas*, via une acidification du milieu due à la production d'acide gluconique, sur la synthèse de γ -actinorhodine chez *S. coelicolor* M145.

Jusqu'à présent, les études réalisées entre *S. coelicolor* A3(2) et d'autres bactéries telles que *M. xanthus* (Perez et al. 2011), *B. subtilis* (Watrous et al. 2012) ou certains actinomycètes (Traxler et al. 2013) montraient préférentiellement des inductions de la production d'actinorhodine et / ou γ -actinorhodine et d'undécylprodigiosine. Nos résultats sont donc originaux puisqu'ils mettent en évidence une inhibition de la production de γ -actinorhodine chez *S. coelicolor* A3(2).

Dans l'environnement naturel, le rôle principal des acides organiques, notamment de l'acide gluconique et de l'acide 2-cétogluconique, est de solubiliser les minéraux tels que le phosphate inorganique (Uroz et al. 2009; Uroz et al. 2011), améliorant ainsi la croissance des plantes (Haas and Défago 2005; Kamilova et al. 2006). L'acide gluconique a également un rôle dans la régulation de la production de certains composés antimicrobiens (Werra et al. 2009; Fender et al. 2012; Ponraj et al. 2013) et il peut même servir d'agent antimicrobien (Kaur et al. 2006). On peut donc se poser la question de l'impact voire même du rôle écologique de l'inhibition de la synthèse de γ -actinorhodine chez *S. coelicolor* A3(2) via l'acidification du milieu par *Pseudomonas*. D'une part, l'acidification de l'environnement externe par *Pseudomonas* pourrait servir de protection face aux antibiotiques produits par les organismes environnants puisque ces molécules sont généralement faiblement ou mêmes pas actives à pH acide. Toutefois, dans notre cas, les propriétés antibiotiques de l'actinorhodine sont apparemment faibles (Wright and Hopwood 1976), et nous n'avons pas

observé d'effet du composé sur la croissance des souches de *Pseudomonas* dans notre test. Il est donc peu probable qu'une antibiose soit impliquée dans l'interaction observée. Il a récemment été proposé que l'actinorhodine agisse plutôt comme un signal répulsif contre les prédateurs du sol tel que *M. xanthus* (Perez et al. 2011). L'interaction avec *P. fluorescens* BBc6R8 réduirait alors indirectement la protection de *S. coelicolor* contre ces prédateurs. Ces dernières années, les antibiotiques se sont vus attribués un nouveau rôle, ils pourraient servir de molécules de signalisation (Davies 2006; Yim et al. 2007; Davies 2013). Dans cette hypothèse, l'acidification du milieu par les bactéries Gram négatives perturberait donc les communications entre *S. coelicolor* et les microorganismes environnants.

Inversement l'acidification de l'environnement extérieur par *Pseudomonas* pourrait également être avantageux pour *S. coelicolor*. En effet, les acides organiques permettent d'augmenter la solubilité du fer (Kraemer 2004). Par conséquent, la production d'acide gluconique par *Pseudomonas*, permettrait d'augmenter la quantité de fer disponible à partir de l'environnement, non seulement pour eux-mêmes mais aussi pour les microorganismes voisins, tels que *Streptomyces*. L'excrétion de γ -actinorhodine par *S. coelicolor* A3 (2) est stimulée dans un milieu de croissance carencé en fer. Elle se comporterait comme un chélateur de fer (Coisne et al. 1999). Ainsi, l'acidification du milieu augmenterait la solubilité du fer, ce qui expliquerait la non induction de la production de γ -actinorhodine en tant que chélateur.

En conclusion, nos résultats révèlent un nouvel impact de l'acidification du milieu extérieur par *Pseudomonas* sur les partenaires bactériens partageant la même niche écologique. En plus de son rôle connu dans l'altération des minéraux et l'antibiose, l'acide gluconique et son dérivé l'acide 2-cétogluconique, permettraient également d'influencer le métabolisme secondaire de *Streptomyces*.

-Chapitre 3-

Discussion et Conclusions

Discussion générale, perspectives

Conclusions

Le sol forestier est riche en interactions entre organismes et notamment en interactions microbiennes. Antagonisme, coopération font partie de ces interactions dirigée par la mise en place de système de signalisation. La place des métabolites secondaires au sein de ces interactions reste encore largement méconnue.

Afin de mieux appréhender ces interactions, l'objectif de cette thèse était de réussir à mettre en évidence d'une part l'influence des facteurs biotiques dans la synthèse de ces métabolites chez le genre *Streptomyces*, et d'autre part l'impact de ces molécules dans la structuration des communautés microbiennes du sol.

La première partie de ce travail a permis de démontrer l'impact d'une bactérie du sol, *P. fluorescens* BBc6R8, sur la synthèse de métabolites secondaires chez *S. ambofaciens* ATCC 23877 et *S. coelicolor* A3(2). Des mécanismes différents ont été mis en évidence dans chacune des interactions. La mise en place d'un effet ping-pong avec éventuellement l'implication d'un mécanisme de quorum quenching d'une part et la synthèse d'acide gluconique d'autre part. Ce travail suggère donc que les bactéries du sol développent diverses stratégies pouvant influencer le métabolisme secondaire d'autres bactéries avec lesquelles elles interagissent.

Dans un second temps, nous avons identifié un effet potentiel des métabolites secondaires sur le fonctionnement de populations microbiennes du sol. En effet, un phénomène de piratage de sidérophores entre *P. fluorescens* BBc6R8 et *S. ambofaciens* ATCC 23877 a été mis en évidence.

L'ensemble de ces résultats s'organise autour de deux axes. D'une part un axe moléculaire centré sur l'analyse des différents acteurs moléculaires, des schémas d'interactions protéiques, impliqués dans la mise en place des interactions entre microorganismes. Et d'autre part, un axe orienté vers l'écologie fonctionnelle et intégrative de ces interactions à l'échelle de la niche écologique des microorganismes. L'objectif étant de combler la séparation entre interactions au niveau cellulaire et mise en place d'un caractère fonctionnel dans un écosystème. Au final, nos travaux ont révélé l'existence de dialogues entre les genres *Pseudomonas* et *Streptomyces*, ces derniers font partie de deux des trois phyla (Protéobactéries, Acidobactéries, Actinobactéries) les plus représentés dans les sols forestiers (Baldrian et al. 2012; Schneider et al. 2012).

1. Influence de la bactérie du sol *P. fluorescens* BBc6R8 sur la production de métabolites secondaires chez *Streptomyces*

1.1. Rôle du quorum quenching sur la synthèse de kinamycine chez *S. ambofaciens* ATCC 23877

Les résultats obtenus durant la thèse mettent en évidence un dialogue moléculaire, qualifié d'effet « ping-pong » (Angell et al. 2006; Riedlinger et al. 2006; Deveau et al. 2010; Schneider et al. 2012), entre *S. ambofaciens* ATCC 23877 et *P. fluorescens* BBc6R8 sur milieu R2 gélosé. Ce dialogue aboutit à l'abolition de l'induction de la synthèse de kinamycine chez *S. ambofaciens* ATCC 23877.

Même si l'ensemble des acteurs moléculaires ou leurs fonctions n'a pu être identifié chez *P. fluorescens* BBc6R8, nos résultats permettent néanmoins d'émettre l'hypothèse que le mécanisme impliqué dans l'interaction entre ces deux partenaires pourrait être un mécanisme de quorum quenching (QQ).

L'une des hypothèses évoquées dans la partie résultats est que la souche BBc6R8 détecterait la présence de *S. ambofaciens* ATCC 23877 par la perception de la molécule signal de QS, de la kinamycine ou éventuellement d'une autre molécule qui resterait à identifier. L'analyse de l'expression des gènes de biosynthèse de la molécule signal et de la kinamycine, respectivement *samL/R0196* et *alpA*, révèle que le gène responsable de la production de la molécule signal est légèrement exprimé en début de croissance contrairement à l'expression du gène *alpA*. Ainsi l'hypothèse irait plus dans le sens de la molécule signal ou d'un autre composé comme facteur « d'induction » reconnu par *P. fluorescens* BBc6R8. Après avoir détecté la présence de *S. ambofaciens* ATCC 23877, *P. fluorescens* BBc6R8 produirait une enzyme capable de dégrader la molécule signal contrôlant la production de kinamycine chez *S. ambofaciens* ATCC 23877. Une hypothèse alternative est que *P. fluorescens* BBc6R8 pourrait synthétiser non pas une enzyme de dégradation mais une molécule capable de se fixer à AlpZ et qui entrerait donc en compétition avec la molécule signal produite par *S. ambofaciens*.

P. fluorescens BBc6R8 ne produit cependant pas de molécule signal analogue aux molécules signal que l'on retrouve chez le genre *Streptomyces*. L'analyse du génome de *P. fluorescens* BBc6R8 a même révélé qu'il ne produirait aucune molécule signal, parmi celles connues comme étant produites par les *Pseudomonas* telles que les AHL. Si la souche BBc6R8 produit des molécules signal, celles-ci sont inconnues; elles n'ont pas été identifiées par les méthodes classiques (biosenseurs, chromatographie sur couche mince) ni par analyse du génome.

En revanche, il n'est pas impossible que la souche BBc6R8 produise un autre composé capable d'aller se fixer à AlpZ et d'inhiber ainsi la cascade de QS de *S. ambifaciens*. Une analyse *in silico* sur le génome de la souche BBc6R8 permettrait de détecter d'éventuels composés candidats. Il s'agira ensuite de réaliser des expériences de retard sur gel avec ce composé purifié, la molécule signal, AlpZ et un ADN cible d'AlpZ. Si le composé analogue de compétition est capable de se fixer sur AlpZ, il empêchera la véritable molécule de se fixer et n'entraînera pas la dissociation d'AlpZ de ADN cible (pas de changement de conformation ou alors différent de celui induit par la vraie molécule signal). Il n'y aura donc pas de retard contrairement à la même expérience réalisée avec la molécule signal seule.

Le criblage de la banque de mutants aléatoire de *P. fluorescens* BBc6R8 a révélé l'implication d'au moins neuf acteurs protéiques différents au cours de cette interaction. Bien que des fonctions putatives aient pu être attribuées à chacun d'entre eux, une analyse *in silico* plus approfondie permettra de conforter ces hypothèses. Il s'agira ensuite de valider expérimentalement ces fonctions par exemple par la construction de mutants et analyse des phénotypes associés. Au final, un schéma réactionnel du dialogue moléculaire mis en place entre les deux bactéries sera réalisé. Le criblage de la banque de mutants aléatoires de BBc6R8 comprend des redondances. La banque n'est pas "représentative", son taux de couverture n'est pas total. Ainsi cette banque ne contient pas les mutants pour l'ensemble des gènes de la souche BBc6R8. Certains acteurs protéiques impliqués dans l'interaction n'ont donc peut-être pas été identifiés. Les premières analyses ont mis en évidence l'intervention potentielle d'une amidohydrolase putative chez *P. fluorescens* BBc6R8. Afin de déterminer si cette enzyme intervient bien dans le dialogue moléculaire mis en place entre les deux organismes, il serait intéressant de faire de l'expression hétérologue chez *E. coli* et de purifier la protéine. Ensuite, il s'agira d'ajouter cette protéine purifiée à des extraits de molécules signal provenant de *S. ambifaciens* ATCC 23877 et de réaliser une expérience de retard sur gel en présence de la protéine AlpZ et une séquence ADN cible d'AlpZ. Des expériences de retard sur gel impliquant la molécule signal ont déjà été réalisées au laboratoire Dynamic. Il s'agira donc de comparer les résultats en présence et en absence de la protéine purifiée.

Si l'on replace cette interaction dans l'environnement sol, et notamment le phénomène de quorum quenching, selon la spécificité d'action de la molécule effectrice de QQ, l'impact sur les organismes environnants peut être ciblé ou général.

Si l'enzyme de dégradation cible une large gamme de molécules signal telles que des molécules à noyau lactone, elle aura un impact sur de nombreux organismes. En effet, les lactonases sont capables de dégrader des acyl-homosérines lactones, produites par une majorité de bactéries Gram négatives, ainsi que des butyrolactones, molécules produites par les Streptomycètes et par certains autres genres d'Actinomycètes comme *Kitasatospora setae*. Si la molécule effectrice est un analogue de compétition, elle pourra également être relativement aspécifique, elle ciblera alors de nombreux récepteurs et affectera une plus

grande partie de la communauté. Par exemple, *P. aeruginosa*, *S. liquefaciens* et *A. hydrophila* produisent les mêmes C4-HSL (Winson et al. 1995; Eberl et al. 1996). Produire un facteur de QQ plutôt aspécifique peut ainsi permettre à l'organisme d'augmenter son périmètre d'action.

En revanche, si l'enzyme ne dégrade qu'un certain type de molécule ou que l'analogue de compétition ne se fixe qu'à peu de récepteurs, l'action du mécanisme de QQ sera très ciblée. Par exemple, des études ont révélé que certaines butyrolactones d'une espèce de *Streptomyces* ne sont pas ou que très faiblement reconnues par les protéines réceptrices d'autres espèces de *Streptomyces* (Kitani et al. 1999). Il n'y aurait donc pas de régulation croisée. De manière similaire, un analogue de compétition ne pourrait se fixer qu'à un type restreint de récepteur et n'agirait qu'au niveau d'une colonie ou qu'entre colonies de même espèce. De même les récepteurs des butyrolactones ne fixent pas les furannes chez *Streptomyces*, les analogues de compétition seront donc également différents. Ainsi, la structure de l'analogue de compétition est déterminante puisqu'elle doit être reconnue par le récepteur ciblé. Par exemple, la longueur de la chaîne acyle des AHL ou sa flexibilité sont des paramètres importants. Des analogues avec une chaîne plus longue sont des inhibiteurs plus efficaces que ceux avec des chaînes moins longues (Hentzer and Givskov 2003). Ainsi, des AHL à longues chaînes ont un rôle antagoniste chez *Chromobacterium violaceum* et *Aeromonas hydrophila*, ils inhibent la production du composé bioactif violaceine et d'exoenzymes. En ce qui concerne *S. ambofaciens*, un analogue de compétition de la molécule signal doit pouvoir se fixer à AlpZ qui est un régulateur de la famille GABR (voir partie Résultats 3.1.2.). Pour déterminer si l'analogue de compétition est spécifique ou pas d'AlpZ, il serait intéressant de le mettre en présence d'autres régulateurs de la famille GABR afin de déterminer s'il se fixe ou non à ces récepteurs.

Le sol est le lieu de nombreux échanges, les mécanismes de QQ peuvent être appréhendés de différentes manières. En effet, contrer la communication des organismes environnants peut permettre au producteur d'éliminer les communications « parasites » pour pouvoir lui-même communiquer plus clairement. D'autre part, contrer la communication des autres organismes permet d'inhiber la production de métabolites secondaires antagonistes par exemple. Cela permet ainsi aux producteurs de se protéger. Les stratégies de QQ sont multiples puisqu'elles impliquent des acteurs différents qui ont des spécificités différentes.

1.2. Rôle de l'acide gluconique sur la synthèse de γ -actinorhodine chez *S. coelicolor* M145

Dans le cadre de l'interaction entre *S. coelicolor* A3(2) et *P. fluorescens* BBc6R8, l'acidification du milieu, via la synthèse d'acide gluconique par *P. fluorescens*, inhibe la production de γ -actinorhodine chez *S. coelicolor*. La production de cet acide nécessite la

présence du cofacteur PQQ. En effet, un mutant de *P. fluorescens* BBc6R8 présentant une insertion dans le gène *pqqE*, gène important pour la production du facteur PQQ (Miller et al. 2010; Gliese et al. 2010), n'acidifie plus le milieu et n'impacte plus la synthèse de γ -actinorhodine. Le complémentant possédant le gène *pqqE* quant à lui retrouve sa capacité à acidifier le milieu et impacter la synthèse du pigment bleu.

Nous démontrons ainsi que la synthèse de certains métabolites peut moduler les facteurs physico-chimiques du milieu et influencer de manière indirecte la synthèse de métabolites secondaires chez d'autres organismes.

Contrairement à l'interaction entre *S. ambofaciens* ATCC 23877 et *P. fluorescens* BBc6R8, il ne s'agit pas ici d'un dialogue moléculaire entre les deux partenaires. En effet la synthèse d'acide gluconique par *P. fluorescens* BBc6R8 est constitutive sur le milieu 26A. Ainsi, il ne s'agit pas d'un mécanisme d'induction lié à la présence de *S. ambofaciens* ATCC 23877 mais d'une modification d'un paramètre physico-chimique de l'environnement qui intervient dans l'inhibition de la production de γ -actinorhodine. La voie de biosynthèse de l'actinorhodine n'est pas affectée puisque cette dernière est produite sous forme intracellulaire. Seule la modification en sa forme lactone ne se produit pas. L'acide gluconique est connu pour avoir de nombreux rôles dans le sol mais cette interaction permet de mettre en évidence une de ses nouvelles fonctions, influencer le métabolisme secondaire chez des organismes voisins. On pourrait penser que cet effet n'est qu'un effet secondaire de l'acide gluconique or la liste de ses multiples actions montre bien que cette molécule joue un rôle important au sein des communautés microbiennes des sols. L'inhibition de la production de certains agents antagonistes ou de signalisation pourrait bien être une autre de ses fonctions sélectionnée au cours du temps. Des exemples de la littérature vont dans ce sens. Par exemple, *Pseudomonas fluorescens* Pf29A réduit l'impact du piétin-échaudage, maladie tellurique du blé provoquée par le champignon *Gaeumannomyces graminis* var. *Tritici*. Son action antifongique est due à une acidification du milieu provoquée par la synthèse d'acide gluconique. Ainsi l'acide gluconique, via la diminution du pH environnemental peut avoir une action directe sur l'activité antagoniste de la souche Pf29A *in situ* (Delalande 2002).

L'acide gluconique est l'acide le plus produit dans les sols, il est produit par les bactéries Gram négatives (Rodriguez and Fraga 1999). Son rôle principal tout comme celui de tout acide dans le sol est de solubiliser les minéraux comme le phosphate inorganique par exemple (Uroz et al. 2009; Uroz et al. 2011). L'acide gluconique régule aussi la production de composés antimicrobiens (Werra et al. 2009) et joue lui-même le rôle d'antifongique. Enfin, il affecte la biosynthèse de sidérophores tels que la pyoverdine chez *Pseudomonas putida* S11 (Ponraj et al. 2013) et donc affecte l'efficacité de colonisation de la rhizosphère car ces sidérophores sont essentiels pour une colonisation racinaire efficace (Loper and Henkels 1999). Il n'a pas d'effet sur l'expression mais sur la synthèse et la maturation périplasmique de la pyoverdine et sa sécrétion (Ponraj et al. 2013). Ce dernier point semble être identique

au mécanisme mis en évidence dans l'interaction entre *S. coelicolor* M145 et *Pseudomonas* BBc6R8. En effet, tout comme la pyoverdine chez *P. putida*, l'expression des gènes de biosynthèse de l'actinorhodine n'est pas affectée, c'est la maturation du métabolite au moment du transport qui l'est.

De plus, tout comme la pyoverdine, la γ -actinorhodine a aussi un rôle de chélateur de fer. Or les acides organiques augmentent la solubilité du fer, ceci pourrait donc expliquer qu'en sa présence, il n'y a donc plus besoin de produire des agents de chélation, donc de γ -actinorhodine ou de pyoverdine. À cela s'ajoute le fait que grâce à ses groupes carboxyles et hydroxyles, l'acide gluconique a lui-même des fonctions de chélation (Welch et al. 2002; Kim et al. 2005). Il serait intéressant de réaliser, chez la souche BBc6R8 par exemple, un double mutant incapable de produire les sidérophores pyoverdine et énanthio-pyochéline. La mise en culture de ce mutant sur des milieux différemment carencés en fer permettra de suivre l'induction de la production d'acide gluconique et de déterminer son efficacité de chélation par rapport à la pyoverdine par exemple.

En ce qui concerne la spécificité de l'interaction, l'inhibition de la γ -actinorhodine chez *S. coelicolor* M145 ne serait donc pas limitée à certains *Pseudomonas*. En effet, elle pourrait avoir lieu en présence d'autres organismes acidifiant le milieu. Réaliser des cocultures entre *S. coelicolor* M145 et ces autres organismes sur milieu R2 gélosé pourrait donc être une expérience intéressante à réaliser. L'inhibition pourrait être plus fréquente dans la rhizosphère qui est un lieu de « hotspots » bactériens. L'exsudat des plantes racinaires contient un fort taux de glucose ce qui stimule la synthèse d'acide gluconique par les bactéries (Willig et al. 2000). De plus, dans le sol, d'autres acides sont produits comme ceux identifiés chez les souches bactériennes altérantes mais aussi chez les plantes (Rodriguez and Fraga 1999; Mueller et al. 2012).

1.3. Impact de ces interactions dans l'écosystème sol

Si l'on replace ces deux interactions au sein de l'écosystème sol forestier, on peut se demander quel est ou quels sont les impacts de l'inhibition de la production de kinamycine et de γ -actinorhodine, donc de métabolites secondaires, sur la structuration des communautés microbienne de sol. Deux cas peuvent être discutés.

Dans le premier cas, nous assimilerons le métabolite secondaire à une molécule antagoniste. Dans le second, nous assimilerons le métabolite secondaire à une molécule de signalisation.

1.3.1. Le métabolite secondaire est une molécule à activité antagoniste

1.3.1.1. Stratégie de protection

Si le métabolite secondaire peut être considéré comme une molécule antagoniste, l'une des hypothèses pourrait être que le *P. fluorescens* inhibe la production de ce métabolite chez *S. ambofaciens* et *S. coelicolor* pour s'en protéger. La kinamycine et la γ -actinorhodine sont des molécules de type polyketide de la famille des angucyclinones pour la première, de la

famille des benzoisochromanequinones pour la seconde. La kinamycine est connue pour agir contre les bactéries à Gram positives (Gould 1997). Quant aux propriétés antibiotiques de la γ -actinorhodine, elles semblent faibles et sont encore mal connues (Wright and Hopwood 1976). Cependant, il a été montré qu'elle pouvait jouer un rôle de signal répulsif contre *M. xanthus* (Perez et al. 2011). L'inhibition de la production de ces métabolites secondaires peut donc être une stratégie de protection pour les bactéries qui cohabitent avec *Streptomyces* dans le même environnement.

Certaines molécules produites par des organismes à proximité de *P. aeruginosa* interfèrent avec ses mécanismes de quorum sensing médiés par AHL. Ceci a pour conséquence d'une part, la réduction de la production des facteurs de virulence et, d'autre part, la déstructuration du biofilm de *P. aeruginosa* (Hentzer et al. 2002). Les mécanismes de QQ peuvent donc être une bonne stratégie pour, à la fois se protéger de molécules à activité antagoniste et à la fois influencer sur la structuration de la population microbienne antagoniste. De même, les molécules à activité antibiotique sont souvent peu actives à pH acide. Ainsi, acidifier le milieu peut également être une bonne stratégie de protection à large spectre contre des molécules à activité antagoniste ou même des signaux répulsifs.

Toutefois, *P. fluorescens* BBc6R8 ne semble pas, d'après les expériences réalisées durant cette thèse, sensible à la kinamycine ou à la γ -actinorhodine. En effet, sa croissance est similaire en absence ou en présence de *S. ambofaciens* ATCC 23877 ou *S. coelicolor* M145. Néanmoins pour confirmer ces observations, il serait nécessaire de réaliser un suivi de la croissance de *P. fluorescens* BBc6R8 en milieu liquide en présence de *S. ambofaciens* ou *S. coelicolor* ou de l'antibiotique purifié. Pour ce faire, il faudrait tout d'abord optimiser la coculture, notamment par l'utilisation de chambres de cultures particulières puisque les premiers essais de cocultures en erlenmeyers simples se sont révélés infructueux. En effet, la vitesse de croissance des deux partenaires est différente, *Pseudomonas* envahit rapidement le milieu et ne permet pas aux *Streptomyces* de se développer correctement.

1.3.1.2. Stratégie de protection des partenaires

Une hypothèse alternative qui peut être envisagée, si l'on considère toujours que le métabolite est une molécule à activité antagoniste, est que l'absence de kinamycine ou de γ -actinorhodine pourrait favoriser le développement des partenaires de *P. fluorescens* BBc6R8 dans l'environnement. Il s'agirait ainsi d'un comportement de coopération. Comme décrit précédemment, *P. fluorescens* BBc6R8 est une bactérie MHB (Mycorrhiza Helper Bacteria), notamment retrouvée en association avec le champignon mycorhizien *L. bicolor*, mais qui peut également être en interaction avec d'autres microorganismes localisés au niveau de la mycorrhizosphère et de la rhizosphère. Certains d'entre eux pouvant être sensibles à des antibiotiques de la famille des angucyclinones ou des benzoisochromanequinones. *P. fluorescens* pourrait donc, pour favoriser l'installation de ces bactéries ou autres

organismes, inhiber la production de kinamycine, de γ -actinorhodine ou d'autres métabolites à activité antagoniste produit par les *Streptomyces* avoisinant.

Des organismes tels que les champignons mycorhiziens sont connus pour sélectionner des bactéries favorisant la mise en place de la symbiose. Une de nos hypothèses serait donc qu'un processus de sélection comparable à celui décrit chez les champignons pourrait être retrouvé dans des populations de *P. fluorescens* (Garbaye 1994; Frey-Klett et al. 2007). En effet, une distribution différente des communautés bactériennes selon les différents compartiments du sol a pu être observée. Les champignons sélectionnent des communautés bactériennes avec des caractéristiques fonctionnelles différentes. Le sol nu est en effet riche en bactéries capables d'hydrolyser la cellobiose et le N acétyl-glucosamine, alors que l'ectomycorhizosphère est plutôt riche en bactéries hydrolysant le gluco-pyranoside et la chitine (Uroz et al. 2013). Dans le sol nu, les communautés bactériennes avec un fort pouvoir d'altération des minéraux sont sélectionnées, permettant ainsi une complémentarité fonctionnelle entre les champignons et les bactéries afin de promouvoir la nutrition des arbres (Uroz et al. 2007; Uroz et al. 2013). Un des mécanismes pour stimuler le développement des populations bactériennes est donc d'inhiber la présence d'organismes compétiteurs ou dans notre cas, d'inhiber la production par ces organismes de métabolites antagonistes.

1.3.1.3. Inhiber l'activité de biocontrôle

Certains organismes produisent des métabolites actifs afin d'éloigner les organismes antagonistes et de protéger la plante et les communautés microbiennes environnantes. Inhiber la production de ces molécules peut donc laisser la porte ouverte à de nombreux organismes virulents et leur laisser ainsi l'occasion de s'installer et d'attaquer. Cette stratégie pourrait être utilisée dans le cadre de coopération entre pathogènes par exemple. En effet s'il existe une coopération dans le cadre des symbioses, il existe également des coopération chez les pathogènes, avec la présence de bactéries auxiliaires de pathogénicité (Derray et al. 1999).

1.3.2. Le métabolite secondaire est une molécule de signalisation

Si l'on considère à présent que le métabolite secondaire peut jouer le rôle de molécule de signalisation, inhiber sa production pourrait se révéler être un moyen très efficace pour contrer la communication entre certains organismes du sol et ainsi inhiber leur développement, la structuration ainsi que la composition des communautés microbiennes du sol.

La γ -actinorhodine est la forme lactone diffusible de l'actinorhodine. Ses capacités antagonistes sont faibles, elle peut être un signal répulsif contre *M. xanthus* et son rôle de chélateur est secondaire. Une hypothèse pourrait être que cette molécule joue le rôle de molécule signal.

Comme de nombreuses molécules signal, elle porte un noyau lactone. L'inhibition de sa production par *P. fluorescens* via l'acidification du milieu influencerait donc la diffusion du message qu'elle véhicule. Ainsi une des perspectives de ce travail pourrait être de déterminer quels sont les phénotypes régulés, modulés, par la γ -actinorhodine et ainsi déterminer quels phénotypes *Pseudomonas* impacte en inhibant la production de γ -actinorhodine.

Comme cité dans l'introduction, à faible concentration, les antibiotiques peuvent interférer dans la mise en place de systèmes de QS et donc influencer divers processus tels que la transcription, la traduction des protéines, le transport d'exoprotéines, la réponse générale au stress, la synthèse du peptidoglycane, la production d'exopolysaccharides, la virulence, le quorum sensing et la formation de biofilm (Goh et al. 2002; Linares et al. 2006; Davies 2006). Il y a modulation, soit induction soit répression, de l'activité de certains promoteurs transcriptionnels. Inhiber la production d'antibiotiques peut donc interférer avec cette signalisation et impacter la structuration des communautés microbiennes du sol.

Cette stratégie peut être abordée sous deux angles : i) contrer cette communication peut être un moyen efficace de lutter contre l'implantation de compétiteurs ou de pathogènes bactériens ou de végétaux ; ii) cela peut être un moyen pour des pathogènes de déstructurer les communications chez leur cibles. Sous forme de biofilms, les bactéries sont plus résistantes aux molécules antagonistes tels que les antibiotiques grâce à une protection physique mais également à une mutualisation des systèmes de protection, tels que des enzymes de dégradation (Mah et al. 2003; Zhang et al. 2013). Ainsi, inhiber la formation de biofilm rendra les bactéries plus sensibles aux antibiotiques.

Pour conclure empêcher la production de métabolites secondaires peut avoir deux impacts. En effet puisque certaines molécules présentent un effet hormétique, empêcher leur production permettra de contrer leur activité antagoniste et/ou leur activité de signalisation.

1.3.3. Dégradation des molécules signal régulant le QS

1.3.3.1. Contrer les communications

L'une des hypothèses évoquées précédemment est que *P. fluorescens* BBc6R8 produit une enzyme qui dégrade la molécule signal impliquée dans la cascade de régulation de la synthèse de kinamycine. Si tel est le cas, en plus d'inhiber la production de kinamycine, il y a également une absence partielle ou totale de molécules signal.

Si on se place dans l'hypothèse où la γ -actinorhodine est considérée comme une molécule signal, *P. fluorescens* BBc6R8 empêche également sa présence dans l'environnement.

Or dans l'écosystème sol, les communications n'ont pas seulement lieu entre unités de la même espèce, elles ont lieu aussi entre des espèces différentes et même des règnes différents. L'absence d'une molécule signal impactera donc les cellules d'une même d'une

même population mais potentiellement aussi celles des autres espèces voire même des organismes d'autres règnes.

En effet, certaines bactéries de genres différents produisent des AHL similaires, une communication croisée a été observée. Par exemple *P. aeruginosa*, *Serratia liquefaciens*, *Aeromonas hydrophila* produisent tous des C4-HSL, une reconnaissance croisée des molécules signal par leur récepteur est donc possible (Winson et al. 1995; Eberl et al. 1996). De même, des mécanismes de signalisation, ont été mis en place par les eucaryotes et procaryotes afin de se percevoir les uns les autres et de communiquer. Certaines molécules signal bactériennes peuvent modifier le comportement de champignons, de plantes et même de cellules animales (Williams 2007). À forte concentration (200 mM), les 3-oxo-C12-HSL de *P. aeruginosa* inhibe la croissance du champignon *Candida albicans* (Hogan et al., 2004). La molécule signal PQS stimule l'activité pro et anti inflammatoire selon sa concentration sur différents modèles animaux (Telford et al., 1998; Smith et al., 2002; Chhabra et al., 2003; Hooi et al., 2004; Pritchard et al., 2005).

Dégrader ou inhiber la présence de molécules signal dans l'environnement peut donc altérer la communication entre les règnes et perturber l'équilibre et la structure de l'ensemble des interactions.

1.3.3.2. Se fournir en nutriments

Des études ont montré que des molécules signal dégradées telles que des AHL pouvaient servir de source de nutriments. La souche isolée du sol *Pseudomonas* PAI-A, dégrade les 3-oxododécanoyl-homosérine lactones (3OC12HSL) et d'autres AHL à longues chaînes et les utilise comme seule source d'énergie pour la croissance (Huang et al. 2003). De même *P. aeruginosa* PAO1 dégrade des AHL à longues chaînes via une AHL acylase et une HSL lactonase (Huang et al. 2003). Ainsi la dégradation de la molécule signal chez *S. ambofaciens* ATCC 23877 pourrait en plus d'inhiber la production de kinamycine, fournir des nutriments à *Pseudomonas*. Afin de tester cette hypothèse, des cocultures en milieu R2 liquide entre la souche BBc6R8 mutée dans le gène codant le facteur de QQ et *S. ambofaciens* ATCC 23877 ou entre la souche sauvage de BBc6R8 et *S. ambofaciens* ATCC 23877 pourront être réalisées. Si la molécule dégradée est source de nutriments, la croissance de la souche sauvage devrait être stimulée par rapport à la souche mutée.

En parallèle la purification de l'enzyme de dégradation suivi de l'ajout de cet enzyme à des extraits de molécule signal de *S. ambofaciens* ATCC 23877 pourront être réalisés. L'ajout de ce mélange à une culture en milieu R2 liquide de *P. fluorescens* BBc6R8 permettra de visualiser la stimulation de la croissance de la bactérie par rapport à l'expérience témoin, une culture de *P. fluorescens* BBc6R8 sans ajout de molécule dégradée.

1.4. Les perspectives

Les perspectives de ce travail sont d'une part de réaliser une interaction tripartite en associant le champignon mycorhizien, *L. bicolor*, à cette association bipartite, et étendre par la suite l'étude au niveau d'une interaction quadripartite en incluant les plantes associées à ses partenaires. Cette expérience permettra en premier lieu de déterminer si l'on retrouve au sein de ce microcosme reconstitué les phénotypes observés dans le cadre du travail de thèse. Il s'agira également de déterminer si d'autres métabolites secondaires sont synthétisés et entre en jeu au sein de cette interaction multipartite et ainsi de révéler l'impact direct de chacun des métabolites secondaires sur les partenaires de la symbiose. Il sera également intéressant de replacer cette interaction dans un sol et de suivre l'évolution des populations microbiennes dans chacun des cas. Tout ceci permettra dans un dernier temps de visualiser et extrapoler l'effet des métabolites secondaires sur la structuration des communautés microbiennes de la mycorhizosphère et de la rhizosphère lors de la symbiose. Le modèle ainsi obtenu permettra *in fine* d'appréhender l'impact écologique de *Pseudomonas*, de la kinamycine et γ -actinorhodine dans l'écosystème sol, notamment au niveau de la diversité, de la communication et la structuration.

Il serait également intéressant de regarder l'impact de ces métabolites sur la structure des communautés microbiennes du sol que ce soit dans le sol nu, le sol de la rhizosphère et de la mycorhizosphère. Pour cela, des analyses par TTGE (Temporal Temperature Gel Electrophoresis) ou pyroséquençage pourraient être envisagées.

2. Piratage de sidérophores entre *S. ambofaciens* ATCC 23877 et *P. fluorescens* BBc6R8

L'autre interaction mise en évidence, entre *S. ambofaciens* ATCC 23877 et *P. fluorescens* BBc6R8, a révélé un phénomène de piratage de sidérophores. En effet, en présence des sidérophores de *S. ambofaciens*, les desferrioxamines et la coelicheline, *P. fluorescens* produit ses sidérophores, la pyoverdine et l'énantio-pyocheline de manière très réduite voire nulle.

2.1. Avantage écologique à utiliser les sidérophores desferrioxamines, des sidérophores répandus

Une analyse par BLAST (préciser le nombre de génome) a révélé que les gènes de biosynthèse de la coelicheline ne sont présents que chez peu d'espèces de *Streptomyces* telles que *Streptomyces lividans* ou *Streptomyces griseus*. À l'opposé, la production de

desferrioxamines semble quant à elle être conservée au sein du genre *Streptomyces* (Müller and Raymond 1984; Meiwes et al. 1990). En effet, les gènes de biosynthèse *desABCD* (Barona-Gómez et al. 2004; Kadi et al. 2007) sont retrouvés dans tous les génomes de *Streptomyces* séquencés et chez des genres proches tels que *Salinispora* (Nett et al. 2009). Les desferrioxamines sont également produites par des bactéries Gram négatives (Martinez et al. 2001; Essén et al. 2007b). Ce sont donc des sidérophores répandus dans les sols. D'autre part, si l'on classait les sidérophores en fonction de leur efficacité à capter le fer, les desferrioxamines seraient classées en première position, suivies par la pyoverdine puis la pyochéline (Srifuengfung et al. 2010). Ainsi les desferrioxamines sont des sidérophores répandus dans le sol et très efficaces pour capter le fer. Ces données pourraient donc expliquer l'avantage qu'ont certaines bactéries comme *P. fluorescens* BBc6R8 à détecter et utiliser les desferrioxamines plutôt que de produire leurs propres sidérophores (Challis and Hopwood 2003; Barona-Gomez et al. 2006). De plus la pyoverdine est un sidérophore coûteux à produire (Dumas et al. 2013). Dans un environnement aussi compétitif que le sol il semble plus avantageux d'utiliser des sidérophores de haute efficacité, disponibles à volonté, et ainsi d'économiser son énergie. Des interactions de ce type peuvent entraîner un effet négatif sur la croissance du partenaire qui se fait « voler » ses sidérophores. Or, dans notre cas, *S. ambofaciens* ATCC 23877 continue à se développer normalement. *S. ambofaciens* ATCC 23877 ne sporule pas sur le milieu 26A que ce soit en absence ou présence de *P. fluorescens* BBc6R8. Dans le cadre de cette interaction à deux partenaires sur un milieu gélosé en boîte de Petri, la quantité de sidérophores produite apparaît donc suffisante pour combler les besoins des deux organismes.

Cependant, dans l'environnement sol, de nombreux compétiteurs sont présents, les conditions de survie sont plus rudes et se développer de manière « normale » lorsque l'on subit le piratage de ses sidérophores doit être plus compliqué. Néanmoins, les *Streptomyces* sont représentées à hauteur de 10 % dans les sols, il semblerait donc que les *Streptomyces* aient une stratégie efficace de colonisation et de survie, leur permettant de répondre efficacement en cas de piratage de leurs sidérophores. Une des hypothèses à envisager est, qu'elles aussi, sont capables de pirater des sidérophores. Une des données qui vont dans ce sens est la présence chez *S. ambofaciens* ATCC 23877 et *S. coelicolor* A3(2) de la protéine CdtB, une protéine de liaison aux ferri-sidérophores, qui est capable de se lier aux ferrioxamines et à la ferri-coelichelin (Barona-Gomez et al. 2006; Patel et al. 2010). Par ailleurs, la seconde protéine de liaison aux ferri-sidérophores, DesE, est capable de se lier à différents sidérophores de type tris-hydroxamates mais pas à la ferri-coelichelin (Patel et al. 2010). Des analyses par BLAST révèlent que ce récepteur serait présent chez d'autres *Streptomyces*. Il serait donc intéressant dans un premier temps de regarder son expression au cours de l'interaction entre *S. ambofaciens* ATCC 23877 et *P. fluorescens* BBc6R8 sur le milieu 26A. *S. ambofaciens* serait ainsi peut-être capable de capter des sidérophores de *P. fluorescens* BBc6R8 via ce récepteur.

Dans les sols, cette stratégie de course à l'armement est l'une des stratégies de réponse le plus souvent mis en place. En ce qui concerne la captation du fer, élément primordial pour la vie, c'est certainement cette stratégie qui existe.

2.2. FoxA, un récepteur de sidérophores tris-hydroxamate

Les résultats obtenus durant la thèse révèlent que c'est le récepteur FoxA, un récepteur TonB-dépendant, chez *P. fluorescens* BBc6R8 qui est capable de détecter les ferrioxamines ainsi que la ferri-coelicheline. Pour rappel, ces deux sidérophores sont de la famille des tris-hydroxamates. D'autre part, le récepteur FoxA est connu pour détecter une large spectre de dérivés de ferrioxamines avec différentes longueurs de chaînes ou ponts (Deiss et al. 1998). Le coprogène, un sidérophore de type tris-hydroxamate est également reconnu par FoxA. La desferrioxamine B, la coelicheline et le coprogène sont des sidérophores linéaires. Ces données suggèrent que FoxA pourrait être un récepteur général de sidérophores de type tris-hydroxamate.

Il existe différentes familles de sidérophores. Ces derniers sont classés selon les groupes fonctionnels qu'ils utilisent pour lier le fer. Ces groupes peuvent être des catécholates, des hydroxamates, des (alpha-hydroxy) carboxylates, des phénolates. Certains sidérophores présentent même des ligands mixtes. La plupart des sidérophores bactériens sont des sidérophores de type catécholates puis viennent les hydroxamates tels que les ferrioxamines et les carboxylates. En parallèle, la plupart des sidérophores fongiques sont des sidérophores de type hydroxamates tels que les ferrichromes et le coprogène (Schalk et al. 2011). Le dosage des sidérophores tris-hydroxamate dans les sols varie selon les techniques et selon les sols.).

Ainsi, *P. fluorescens* BBc6R8 a peut-être la capacité de subtiliser un plus grand nombre de sidérophores que les deux détectés dans notre interaction, ils pourraient donc entrer en compétition avec d'autres bactéries et même avec des champignons.

2.3. Le gène *foxA*, un gène répandu

Le gène *foxA* se trouve à l'intérieur de l'opéron *fox*. Ce dernier régule et permet la synthèse du récepteur TonB-dépendant FoxA. Au cours de notre analyse, nous avons mis en évidence que l'opéron *fox* (*foxI*, *foxR*, *foxA* and *pepSY*) est présent chez *P. fluorescens* BBc6R8, il l'est également chez les souches Pf-5, Pf0-1 et *P. aeruginosa* PAO1 (Hartney et al. 2012). D'après les résultats obtenus avec la banque des 60 souches de *P. fluorescens* environnementales, on peut penser qu'elles aussi possèdent le gène *foxA* voire même l'opéron *foxA*. L'équipe de J. Loper a réalisé un arbre phylogénétique concaténé sur dix gènes de ménage provenant de génomes de *P. fluorescens* et d'autres *Pseudomonas* (Loper et al. 2012). D'après cet arbre, *P. fluorescens* BBc6R8, pf0-1, Sbw25, *P. protegens* pf-5 appartiennent à un grand clade, le clade 2789 (Figure 37).

Dans le cadre de la thèse, un arbre phylogénétique a été effectué, en réalisant un Blastx de la séquence protéique de FoxA de BBc6R8 sur les mêmes génomes que ceux utilisés par Loper et al. (Figure 38). Les génomes de *P. syringae* et *P. mendocina* n'ont pas été utilisés dans cette étude qui vise principalement à voir la distribution du gène *foxA* au sein des espèces *P. fluorescens* BBc6R8, pf0-1, Sbw25, *P. protegens* Pf-5. L'arbre a été obtenu en utilisant l'algorithme BioNJ (méthode de distance) mais également l'algorithme phymI (méthode du maximum de vraisemblance), donnant deux arbres identiques. D'après l'arbre présenté dans la figure 41 et les résultats de BLAST synthétisés dans le Tableau 4, on peut remarquer qu'il y aurait deux grands groupes, les espèces possédant peu d'identité avec le gène *foxA* de BBc6R8 (29% à 39% en blastX), le groupe A, et celles possédant une forte homologie, le groupe B. Ce groupe B peut lui-même être divisé en 4 sous-groupes 1, 2, 3 ou 4. D'après cet arbre, la souche *P. fluorescens* SBW25 ne présenterait pas d'homologue de *foxA*, elle appartient au groupe A, ce qui va dans le sens des résultats obtenus dans le cadre de la thèse. Au sein du groupe B, nous retrouvons *P. fluorescens* BBc6R8, Pf0-1 et *P. protegens* Pf-5, tous les trois au sein d'un même sous-groupe, le numéro 4. On remarque donc que la souche *P. fluorescens* Sbw25 qui est regroupée dans un large clade avec *P. fluorescens* BBc6R8, *P. fluorescens* Pf0-1 et *P. protegens* Pf-5 dans l'arbre de J. Loper ne présente que peu d'identité avec ces dernières dans l'arbre FoxA. D'après l'arbre, deux hypothèses seraient possibles, acquisition par transfert horizontal du gène *foxA* par *P. fluorescens* BBc6R8, Pf0-1 et *P. protegens* Pf5 ou perte du gène *foxA* chez *P. fluorescens* SBW25. Une analyse plus approfondie est nécessaire pour pouvoir conclure. Une analyse du contexte génomique de ces opérons pourrait permettre de savoir s'ils sont encadrés par des séquences caractéristiques de transferts horizontaux. Dans le cas du génome de BBc6R8, très peu de signe d'acquisition de gènes par transfert horizontal on pu être détectés lors de l'analyse globale du génome (communication personnelle), ce qui irait plutôt dans le sens d'une perte de *foxA* chez Sbw25 que d'un tranfert horizontal.

Au sein du clade B, un regroupement des souches de la même espèce peut être observé notamment pour les espèces de *P. aeruginosa* et *P. putida* révélant une certaine conservation de ce gène au sein des espèces le possédant. Ceci témoigne bien de sa distribution répandue au sein des *Pseudomonas*.

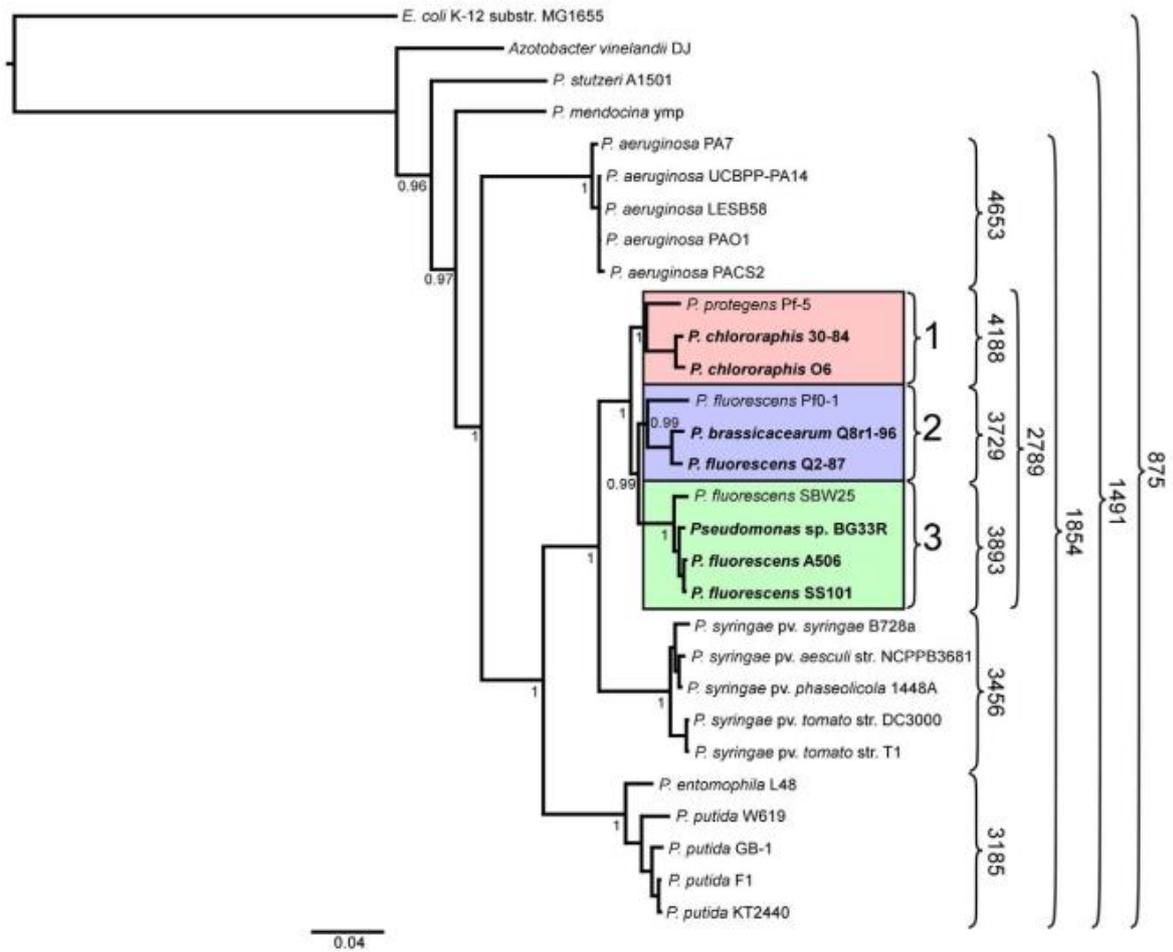


Figure 37 : Arbre phylogénétique montrant les liens entre souches de *Pseudomonas* séquencées (D'après Loper et al, 2012).

L'arbre est basé sur des alignements concaténés de 10 gènes de ménage : *acsA*, *aroE*, *dnaE*, *guaA*, *gyrB*, *mutL*, *ppsA*, *pyrC*, *recA*, et *rpoB*.

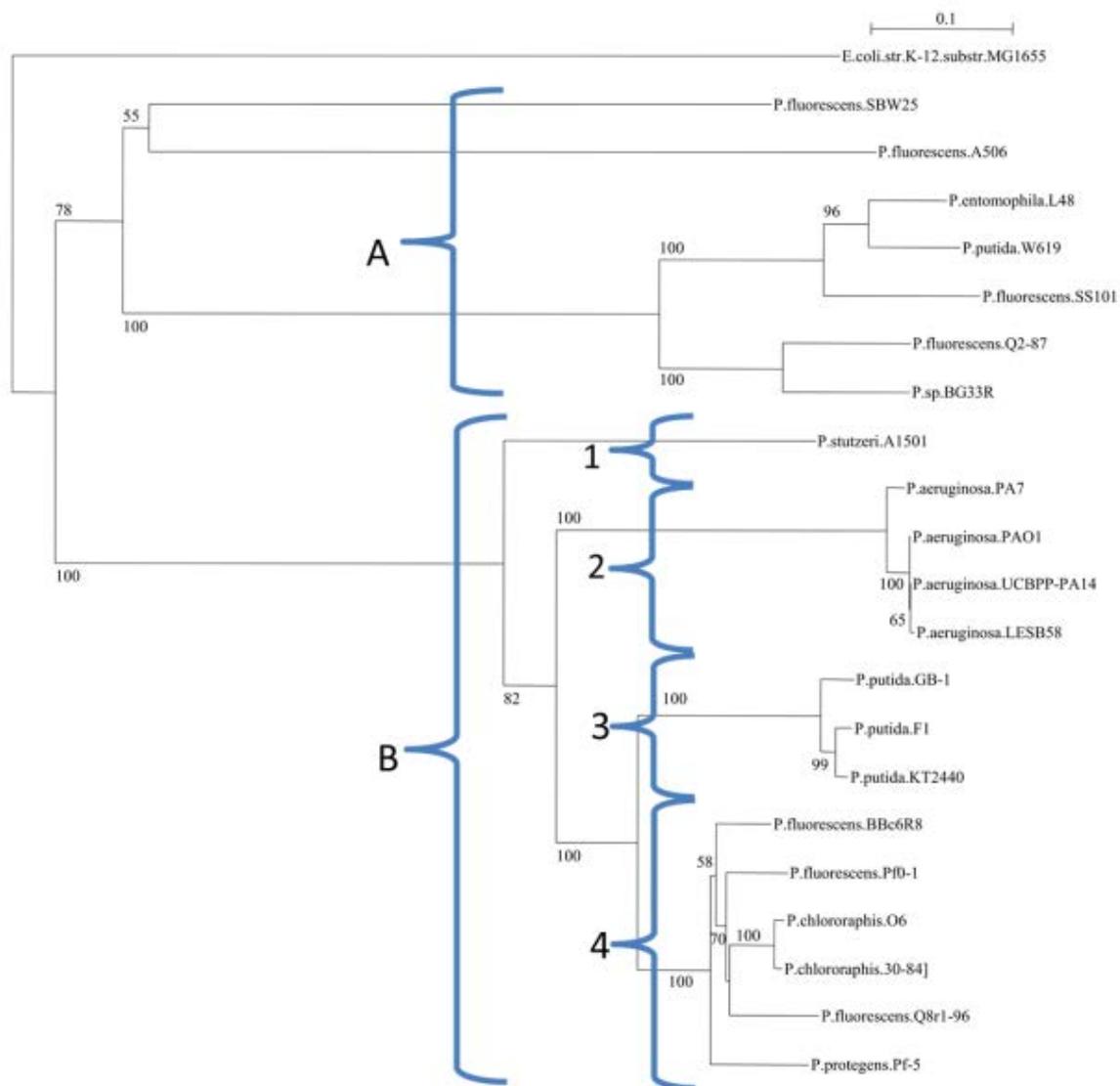


Figure 38 : Arbre phylogénique du gène *foxA* au sein de souches séquencées appartenant au genre *Pseudomonas*

L'arbre est basé sur les alignements du gène *foxA* des différentes souches dont le génome a été séquencé, il a été réalisé avec le logiciel seaview selon la méthode des distances avec l'algorithme BioNJ (méthode de distance) et le modèle K2P mais également l'algorithme phymI (méthode du maximum de vraisemblance).

Tableau 4 : Paramètres des BlastP obtenus en comparant différentes séquences de *Pseudomonas* sp. avec la séquence FoxA de *P. fluorescens* BBc6R8

BlastP avec la séquence FoxA de la souche BBc6r8			
Souche	Query cover %	Evalue	% identity
E.coli K12 MG1655	85	3,00E-157	39
A. vinelandii	96	4,00E-135	36
P.stutzeri A1501	98	0,00E+00	63
P.mendocina ymp	94	7,00E-157	37
P.aeruginosa PA7	95	0,00E+00	66
P.aeruginosa UCBPP-PA14	93	0,00E+00	67
P.aeruginosa LESB58	93	0,00E+00	66
P.aeruginosa PAO1	93	0,00E+00	67
P.aeruginosa PACS2	-	-	-
P. protegens Pf-5	100	0,00E+00	84
P. chlororaphis 30-84	100	0,00E+00	87
P. chlororaphis O6	98	0,00E+00	87
P. fluorescens PfO-1	96	0,00E+00	88
P.brassicacearum Q6r1-96	100	0,00E+00	84
P.fluorescens Q2-87	98	4,00E-172	37
P.fluorescens SBW25	98	0,00E+00	39
P.sp. BG33R	93	7,00E-176	38
P.fluorescens A506	98	3,00E-165	38
P.fluorescens SS101	98	6,00E-167	36
P.syringae pv. syringae B728a	86	6,00E-69	30
P.syringae pv. aesculi str. NCPPB3681	-	-	-
P.syringae pv. phaseolicola 1448A	86	2,00E-66	29
P.syringae pv. tomato str. DC3000	98	0,00E+00	39
P.syringae pv. tomato str. T1	98	0,00E+00	39
P.entomophila L48	98	3,00E-170	36
P.putida W619	94	6,00E-164	37
P.putida GB-1	98	0,00E+00	74
P.putida F1	98	0,00E+00	74
P.putida KT2440	98	0,00E+00	74

Les analyses par BLAST révèlent également que l'on retrouve FoxA chez le végétal *Cucumis sativus*, un concombre, avec un pourcentage d'identité de 49 % et une e-valeur de 0. D'autre part, des études ont montré que le concombre peut entrer en symbiose avec des champignons endomycorhiziens. Des souches de *Pseudomonas fluorescens* auraient notamment été retrouvées impliquées dans l'interaction, améliorant la croissance et l'apport de phosphate aux champignons (Ravnskov et al. 1999). Ainsi, il est possible qu'un ancêtre commun de FoxA soit présent dans le monde végétal puisque les plantes aussi utilisent des sidérophores de type hydroxamate. Par exemple, la plante *Vigna unguiculata*

est capable d'utiliser les sidérophores de type hydroxamate produit par la bactérie *Streptomyces acidiscabies* lorsque l'environnement est carencé en fer (Dimkpa et al. 2008).

Etant donné que les champignons produisent aussi en majorité ce genre de sidérophore, il ne serait pas étonnant de retrouver également un ancêtre de FoxA chez eux. Cependant, les analyses par BLAST ne présentent que des protéines avec des pourcentages d'identité inférieurs à 40%. Si la protéine est présente, elle doit donc être fortement divergente du récepteur FoxA bactérien et même avoir des fonctions différentes.

L'étude *in silico* réalisée par Bodilis et Cornelis a permis de conclure que le récepteur FoxA était retrouvé au sein du core récepteur TonB-dépendant chez les souches de *Pseudomonas aeruginosa*. Une analyse par BLAST a révélé que des homologues de FoxA sont également présents dans diverses espèces de *Pseudomonas* telles que *P. stutzeri*, *P. fulva*, *P. fluorescens*, *P. putida* ou *P. resinovorans* mais également dans différents genres bactériens tels que *Yersinia enterocolitica* (Bäumler and Hantke 1992) ou *Erwinia herbicola* (Berner and Winkelmann 1990). Le récepteur FoxA semble donc répandu dans le monde bactérien mais pourrait également se retrouver chez les champignons voire chez les plantes. Ainsi de nombreux organismes seraient capable de pratiquer le piratage de sidérophores tout du moins de sidérophores de type tris-hydroxamate.

2.4. Le piratage des sidérophores, un mécanisme répandu

Les espèces de *Pseudomonas* possèdent de nombreux récepteurs TonB-dépendant qui leur permettent de détecter des xénosidérophores. D'autres genres bactériens possèdent des récepteurs TonB-dépendants et sont donc capables de reconnaître des sidérophores tris-hydroxamates tels que les ferrioxamines qui sont les plus couramment produits. À titre d'exemple, *Vibrio furnisii* produit le sidérophore fluvibactine mais détecte, à travers l'expression d'un récepteur TonB-dépendant, de la desferrioxamine purifiée ajoutée dans le milieu (Tanabe et al. 2011). De même *Amycolatopsis* sp. AA4, en plus de produire l'amychéline, un puissant chélateur de fer, utilise les desferrioxamines produites par *S. coelicolor* M145 (Traxler et al. 2012).

Ainsi, l'ensemble de ces données suggère que le piratage de sidérophores est probablement extrêmement répandu dans les populations naturelles.

Une théorie en écologie existe sur l'équilibre tricheurs-non tricheurs et la viabilité de systèmes dans lesquels existent plus ou moins de tricheurs. Dans le cadre du piratage des sidérophores, nous pouvons en effet nous poser la question de la réalité de ce piratage dans une population naturelle. S'il y a trop de tricheurs, dans notre cas, s'il y a trop de pirates de sidérophores et surtout de desferrioxamines, ces tricheurs ne seront pas avantagés au final. L'évolution sélectionne ainsi ce type de comportement au-delà d'un certain nombre de tricheurs. Donc dans une population naturelle où de nombreux organismes ont la possibilité de tricher, ce n'est pas évident que tous le feront.

Des études ont mis en évidence la capacité de certaines espèces de *P. stutzeri* à synthétiser des desferrioxamines (Zawadzka et al. 2006; Essén et al. 2007b). D'autre part, Zawadzka et al ont révélé la présence du gène *foxA* dans la souche *P. stutzeri* KC (Zawadzka et al. 2006). L'analyse des génomes de six autres souches séquencées de *P. stutzeri* a également révélé la présence des gènes *foxI*, *foxR*, *foxA* et *pepSY*. Ainsi *P. stutzeri* produit donc de la desferrioxamine et la capte sous sa forme ferrioxamine via le récepteur FoxA. Nous pouvons ainsi émettre l'hypothèse que puisque les producteurs de desferrioxamines sont abondants dans l'écosystème du sol, des souches de *Pseudomonas* ont perdu la capacité, au cours de l'évolution, de synthétiser ces sidérophores. Elles ne présentent plus le cluster *des* mais ces dernières ont gardé la capacité de les détecter via FoxA et font ainsi du piratage. C'est le cas par exemple de *P. fluorescens*. D'ailleurs, dans l'arbre présenté en Figure 2, on peut remarquer que le gène *foxA* des sous-groupes 2, 3 et 4 dérive du gène de *P. stutzeri* A1501 ce qui pourrait aller dans le sens de notre hypothèse.

2.5. Perspectives

Les perspectives de ce travail sont d'une part d'associer le champignon mycorhizien, *L. bicolor*, à cette association bipartite et bien sûr de faire participer la plante associée. L'objectif sera d'analyser si cette interaction se déroule dans ce microcosme recomposé et ainsi de déterminer s'il y a une influence sur la symbiose et donc sur la plante. Ensuite, il sera intéressant de replacer cette interaction dans un sol et de suivre l'évolution des populations microbiennes. Ceci nous permettra ainsi de visualiser l'effet de l'interaction sur la structuration des communautés microbiennes de la mycorrhizosphère et de la rhizosphère.

3. Conclusions

Les métabolites secondaires ont un rôle primordial au sein des interactions microbiennes dans le sol forestier. Ces dernières sont plus complexes que ce que l'on pouvait s'imaginer. En effet, initialement les Hommes assimilaient les bactéries à des unités solitaires. Par la suite, une communication intra-espèce a été mise en évidence à travers le QS. Lorsque les scientifiques ont pris conscience de l'importance de réintégrer les microorganismes dans leur environnement naturel et donc de prendre en compte les interactions qui s'établissent entre les organismes présents dans la même niche écologique, ils se sont rendu compte de l'existence de communications interspécifiques et inter-genres. À l'heure actuelle, nous considérons l'écosystème dans son entier. Il est alors une constatation évidente, les microorganismes communiquent avec de nombreux êtres vivants de leur environnement que ce soit des organismes de la même espèce, d'autres espèces, d'autres genres et même d'autres règnes. Ces interactions ne sont pas unilatérales, elles sont beaucoup plus complexes que ça. Elles font intervenir des dialogues moléculaires avec des jeux de réponses et des mécanismes de régulation très fins. La compréhension de l'ensemble de ces dialogues nécessitent de prendre en compte l'ensemble des acteurs mais également de prendre en compte l'ensemble des paramètres physico-chimiques environnementaux. Cette thèse est un premier pas dans l'avancée de la compréhension à la fois de ces dialogues mais également de l'implication des métabolites secondaires au sein de ces interactions. La

communauté scientifique, en acceptant de sortir de sa pensée stricte du rôle antagoniste des antibiotiques, a ainsi mis en évidence leur rôle en tant que molécule de signalisation. Peut-être, ces molécules nous cachent-elles encore bien d'autres rôles...L'analyse des dialogues moléculaires au sein des écosystèmes nous permettra peut-être ainsi de le découvrir.

La compréhension de cette communication globale qui se déroule autour de nous prendra bien sûr du temps mais elle est nécessaire pour comprendre le fonctionnement du sol forestier, des arbres et *in fine* de l'écosystème forestier, son équilibre, son mécanisme de résilience et ainsi anticiper les impacts du changement climatique en cours sur son fonctionnement.

-Chapitre 4-

Annexes

Annexes

1. Matériels et Méthodes de l'interaction entre *S. ambofaciens* ATCC 23877 et *S. coelicolor* A3(2) sur milieu R2

1.1. Souches bactériennes, conditions de culture et vecteurs utilisés

Toutes les souches de *Streptomyces*, *Pseudomonas*, *Micrococcus*, *Bacillus* et *Escherichia coli* utilisées sont décrites dans le tableau 5. Pour l'analyse des phénotypes, les cultures ont été faites sur milieu R2 (Kieser et al. 2000) à 26,5°C, pour la récolte des spores sur milieu SFM (Kieser et al. 2000).

Les spores de *S. ambofaciens* sont récoltées après 7 jours de culture à 30°C sur milieu SFM solide, par ajout d'eau et par grattage du mycélium à l'aide d'une anse stérile. Après filtration et centrifugation de la solution obtenue, les spores sont resuspendues dans du glycérol 20% (v/v) et stockées à -20°C (Kieser et al. 2000).

Les stocks de cellules de *Pseudomonas* ont été préparés en ensemencant chaque souche sur milieu TSA (contenant de la kanamycine à 20 µg / ml pour les 9 mutants) pendant 48 heures à 26,5 ° C et à 37 ° C pour *P. aeruginosa* PA01. Un clone unique a été remis en suspension dans 50 µl d'eau et étalé sur milieu TSA pendant 48 heures. Les cellules ont été recueillies, centrifugées à 13.500 g pendant 2 min et le culot a été lavé deux fois avec de l'eau stérile. Le culot a été remis en suspension avec de l'eau stérile jusqu'à une DO₆₀₀ de 0,7.

Pour analyser l'effet de *P. fluorescens* BBc6R8 sur la production de kinamycine, spiramycine, congocidine et stambomycine par *S. ambofaciens* ATCC 23877, des cocultures ont été réalisées respectivement sur milieu gélosé R2, MP5 en boîtes de Petri simples ou compartimentées. *Streptomyces* et *Pseudomonas* ont été étalées côte à côte ou de manière perpendiculaire à 3 mm l'une de l'autre et ont été incubées à 26,5°C (37°C avec *P. aeruginosa* PA01) jusqu'à 5 jours. Les stries ont été réalisées avec 2 µl de spores *S. ambofaciens* ATCC 23877 à 10⁷ UFC / ml et 2 µl de cellules de *Pseudomonas* à 10⁹ UFC / ml. Une expérience témoin avec seulement *Streptomyces* a été effectuée pour chaque condition d'incubation.

Pour l'analyse de l'expression du gène *alpV* dans la souche biosenseur ayant pour gène rapporteur le gène codant la GFP (Green Fluorescent Protein), les cultures et cocultures ont été effectuées en microplaques de 48 puits. Chaque puit est rempli avec 900 µl de milieu R2 gélosé. L'analyse de la fluorescence a été réalisée à l'aide du Biotek Synergy HT avec le filtre d'excitation 485/20 et le filtre d'émission 528/20. Toutes les expériences ont été réalisées en triplica.

Pour analyser l'effet du surnageant de cultures ou de cellules mortes de *P. fluorescens* BBc6R8 sur la production de kinamycine par *S. ambofaciens* ATCC 23877, des cultures de la

bactérie ont été réalisées dans 30 mL de milieu R2 liquide. Les cultures ont ensuite été centrifugées à 4500 rpm pendant 20 min et le surnageant filtré avec des filtres de 0,45 µm. Le culot a été autoclavé pendant 20 min à 120 °C. Une goutte de 10 µl de surnageant ou de culot autoclavé a ensuite été déposée sur un tapis de *S. ambofaciens* ATCC 23877 sur du milieu R2 gélosé et a été incubée à 26,5°C pendant 3 jours.

Tableau 5 : Souches bactériennes utilisées

Souches	Caracteristiques	Références
<i>S. ambofaciens</i> ATCC 23877	Souche de référence [sauvage]	(Pinnert-Sindico 1954)
<i>S. ambofaciens</i> ATCC 23877 $\Delta\Delta alpZ$	Souche issue de la souche sauvage dans laquelle les deux copies du gène <i>alpZ</i> ont été délétées.	(Bunet et al. 2008)
<i>M. luteus</i>	Souche sauvage	Collection Dynamic
<i>B. subtilis</i> ATCC 6633	Souche sauvage	Collection Dynamic
<i>E. coli</i> DH5 α	<i>supE44</i> $\Delta lacU169$ ($\Phi 80 lacZ\Delta M15$) <i>hsdR17 recA1 endA1 gyrA96 thi-1 relA1</i>	(Hanahan 1983)
<i>E. coli</i> ET12567(pUZ8002)	Souche donatrice pour la conjugaison intergenerique Souche défectueuse pour la méthylation (<i>dam-13:: Tn9 dcm-6 hsdM Cmr</i>)	(Paget et al. 1999)
<i>P. fluorescens</i> BBc6R8	Isolée from <i>Laccaria bicolor</i>	(Frey-Klett et al. 1997)
<i>P. fluorescens</i> SBW25	Isolée de la rhizosphere de la canne à sucre	(Bailey et al. 1995)
<i>P. fluorescens</i> Pf0-1	Isolée d'un sol d'agriculture	(Compeau et al. 1988)
<i>P. protegens</i> Pf-5	Isolée d'un sol d'agriculture	(Ramette et al. 2011)
<i>P. aeruginosa</i> PAO1	Pathogène opportuniste huamain	(Holloway 1955)
<i>P. fluorescens</i> P4C2	Mutant derive de BBc6R8, insertion de Tn5	(Deveau, non publié)
<i>P. fluorescens</i> P4D1	Mutant derive de BBc6R8, insertion de Tn5	(Deveau, non publié)
<i>P. fluorescens</i> P33C8	Mutant derive de BBc6R8, insertion de Tn5	(Deveau, non publié)
<i>P. fluorescens</i> P4D2	Mutant derive de BBc6R8, nsertion de Tn5	(Deveau, non publié)
<i>P. fluorescens</i> P27A5	Mutant derive de BBc6R8, insertion de Tn5	(Deveau, non publié)
<i>P. fluorescens</i> P4G3	Mutant derive de BBc6R8, , insertion de Tn5	(Deveau, non publié)
<i>P. fluorescens</i> P5H12	Mutant derive de BBc6R8, , insertion de Tn5	(Deveau, non publié)

1.2. Manipulation de l'ADN et analyse transcriptionnelle

1.2.1. Manipulation de l'ADN

L'isolement, le clonage et la manipulation de l'ADN ont été réalisées comme décrit précédemment chez *Streptomyces* (Leblond et al. 1996; Pang et al. 2004), chez *Pseudomonas* (Pospiech and Neumann 1995) et chez *E. coli* (Sambrook et al. 1989).

Les séquences des amorces utilisées (Tableau 6) lors des réactions de polymérisation en chaîne ont été dessinées puis vérifiées à l'aide du logiciel Primer3. Les amorces de synthèse sont fournies par Eurogentec. L'amplification de fragments d'ADN par PCR a été réalisée avec l'ADN polymérase Dreamtaq (Fermentas) à l'aide de l'appareil C1000 (BioRad).

Tableau 6 : Amorces utilisées

Name	Sequence 5'-3'	Studied gene
<i>hrdB</i> -F	CGCGGCATGCTCTTCCT	<i>hrdB</i>
<i>hrdB</i> -R	AGGTGGCGTACGTGGAGAAC	
<i>selR</i> -F	CGACCCGGAGCAGTACAA	<i>selR</i>
<i>selR</i> -R	GCAGCAGATGCAGTGGTAGA	
<i>samL/R0196</i> -F	CACCTTCTTCACCACCAACA	<i>samL/R0196</i>
<i>samL/R0196</i> -R	GACGTTGAATTGGGTGTGG	
<i>alpZ</i> -F	AGGAACTGCGTGCGGAGT	<i>alpZ</i>
<i>alpZ</i> -R	CAGCCACGCACTCTCGG	
<i>alpW</i> -F	TCAGACAGGAACGTGCAGTG	<i>alpW</i>
<i>alpW</i> -R	GCTGGCGAAGTGGAAAGTG	
<i>alpV</i> -F	GAAGTGCTGGGGACGCTG	<i>alpV</i>
<i>alpV</i> -R	TGGTCCGGCGTTGAGGG	
<i>alpU</i> -F	CAGATTCACGACGAGCGG	<i>alpU</i>
<i>alpU</i> -R	CCACAACCTCGTCCACCAGG	
<i>alpT</i> -F	GAGCAGAGCCGCCTGGT	<i>alpT</i>
<i>alpT</i> -R	CCAGGTCCGGTGAGTTCCG	
<i>alpA</i> -F	TGTGGTAGGCGTTGGAGC	<i>alpA</i>

<i>alpA</i> -R	GCCTTCTTCGTGCTGGAG	
<i>samR0477</i> -F <i>samR0477</i> -R	GGAACAGCTCGCCGTA CCGAACTCGTCGGCGTATGG	<i>samR0477</i>
<i>samR0475</i> -F <i>samR0475</i> -R	GGTAGCGCCAGGAGTTCACG GCGCATGGACTCACATGACG	<i>samR0478</i>
<i>samR0466</i> -F <i>samR0466</i> -R	CGGCCGTCAGTTCGTGCAGG TCGCCGACGACGGTGTCA	<i>samR0466</i>
<i>samR0484</i> -F <i>samR0484</i> -R	CTGGAGACCTTCGGGGAGTG TGCCCGAGCACTCCGAAATG	<i>samR0484</i>
<i>srmgl</i> -F <i>srmgl</i> -R	GCTCCGGCTGAAGGTGCAGA TGCCACCGATGCCGAACGAA	<i>srmgl</i>
<i>samR0912</i> -F <i>samR0912</i> -R	GCGCATGGTCATCGTGCAGTAG TTCCGCCGGTTCGAGAACTTCC	<i>samR0912</i>
<i>samR0918</i> -F <i>samR0918</i> -R	CCGACGGCCCAAGTTACTGC CCGGGCGATCTGTTTGTTC	<i>samR0918</i>
<i>samR0919</i> -F <i>samR0919</i> -R	TCCGTCGCCGGTTGAAGTAG GCCGTACATCGCCCTCCATC	<i>samR0919</i>
0099- F 0099-R	CTCCCGATACGACGTTGCTA CTAAATCGCCACCTGTTCCC	MHB_000099
4640-F 4640-R	TACCTGAGCCAGTTGCAGTG GATCTGGTCGGTGATGTCCT	MHB_004640
4866-F 4866-R	CACCTCGACCATCCTGATTT TTGGGGATAAACACGTAGCC	MHB_004866

Afin de localiser l'emplacement du transposon Tn5 dans le génome des mutants de *P. fluorescens* BBc6R8 n'ayant pas d'effet sur la production de kinamycine, une PCR nichée est réalisée sur l'ADN de chacun des 9 mutants. Ces PCR sont réalisées sur colonies : les mutants sont d'abord sélectionnés sur milieu LB avec kanamycine, et une colonie isolée est reprise dans 50µl d'eau.

La première étape comprend un mélange d'amorces aléatoires et une amorce spécifique de Tn5 (mélanges réactionnels et étapes de PCR décrits dans la Figure 40).

Plusieurs produits de PCR seront donc amplifiés ici. Une seconde étape, réalisée à partir des premiers produits de PCR, permet d'amplifier uniquement les fragments ou le transposon est intégrée : elle comprend une amorce spécifique du transposon ainsi qu'une amorce spécifique à la partie connue en 5' des amorces aléatoires (Figure 41).

Les produits de cette PCR nichée sont mis à migrer par électrophorèse sur gel TBE 1x 0,8% agarose. De ce gel sont découpées les bandes majoritaires et une purification de l'ADN est réalisée à l'aide du Thermo Scientific Fermentas GeneJET PCR Purification Kit, en suivant les recommandations du fournisseur. L'ADN ainsi extrait est envoyé au séquençage chez Beckman Coulter Genomics, et les séquences obtenues sont blastées (via les bases de données du site NCBI et INRA) afin d'identifier les gènes mutés.

Première étape		Cycles	
ADN	0,5µl		94°C 5'
Tampon	1µl	8x {	94°C 30"
dNTP	1µl		X 30"
DMSO	0,5µl		72°C 3'
Amorce 1	0,5µl	27x {	94°C 30"
Amorce 2	0,5µl		54°C 30"
Dream Taq	0,1µl		72°C 3'
H2O	5,9µl		72°C 5'
Seconde étape		Cycles	
ADN	2µl		94°C 5'
Tampon	2,5µl	35x {	94°C 30"
dNTP	2,5µl		50°C 30"
Amorce 1	1,5µl		72°C 3'
Amorce 2	1,5µl		72°C 5'
Dream Taq	1µl		
H2O	14µl		

Figure 40 : PCR nichée : mélanges réactionnels et cycles

X=de 62°C à 55°C, baisse d'un degré à chaque cycle.

Les produits de la première PCR sont dilués dans 50µl d'eau avant de reprendre 2µl.

Première étape :

Amorce 1 : PRB 159 (ATCACCTTCACCCTCTCCAC)

Amorce 2 : mélange de CEKG2A (GGCCACGCGTCTGACTAGTACnnnnnnnnnnAGAG)

CEKG2B (GGCCACGCGTCGACTAGTACnnnnnnnnnnnACGCC)

Et CEEK2C (GGCCACGCGTCGACTAGTACnnnnnnnnnnnATAT)

Seconde étape :

Amorce 1 : PRB 160 (CCAGTGAAAAGTTCTTCACC)

Amorce 2 : CEEK4 (GGCCACGCGTCGACTAGTAC)

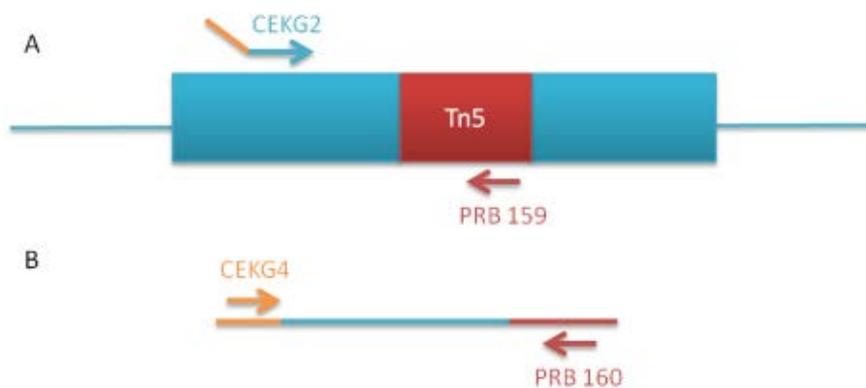


Figure 41 : Principe de la PCR nichée

- (A) La première étape consiste à amplifier aléatoirement un fragment du gène muté. Pour cela une amorce se fixe sur une partie connue du transposon, ainsi qu'un mélange d'amorces aléatoires auxquels a été ajoutée une séquence connue en 5'. Cette première étape comprend une PCR où la température d'hybridation est d'abord élevée afin d'avoir une meilleure spécificité et d'amplifier favorablement les fragments qui nous intéressent.
- (B) Lors de la seconde étape, une amorce se fixe sur la séquence connue en 5'. La deuxième amorce se fixe à nouveau sur une partie connue du transposon. Cette seconde étape permet de diminuer le taux de produits non spécifiques en amplifiant uniquement le fragment d'intérêt.

1.2.2. Analyse transcriptionnelle

Pour l'extraction d'ARN, les cellules ont été recueillies à partir des stries cultivées sur milieu R2 gélosé pendant 2 jours à 26,5 ° C. *Streptomyces* a été cultivée sur une membrane de cellophane. L'extraction a été réalisée avec le kit "ARN total AurumTM Mini kit" (Biorad) selon les instructions du fabricant, à l'exception de l'addition, au cours de la lyse des cellules, d'une étape de sonication (3 x 10 sec) à haute fréquence en utilisant l'appareil Bioruptor. L'ARN a été élué dans un volume final de 30 µl et quantifié avec l'appareil NanoDrop-1000.

Avant la transcription inverse, les échantillons d'ARN ont été traités par la DNase I (1 U de DNase I (Fermentas) en présence de 10 U d'inhibiteur de RNase Ribolock (Fermentas) pour 1 µg de l'ARN). La DNase I a ensuite été inactivée à 65 °C pendant 10 min en présence d'EDTA (2,3 mM). L'absence d'ADN génomique résiduel a été vérifiée par une PCR de 35 cycles en utilisant comme matrice l'ARN extrait et les paires d'amorces hrdB-F/hrdB-R et SeLr-F / SeLr-R pour *Streptomyces* et *Pseudomonas*, respectivement. La transcription inverse a été réalisée avec le kit de synthèse "iScript advanced cDNA RT-PCR quantitative" (Biorad) selon les instructions du fabricant. Les séquences des paires d'amorces utilisées pour amplifier les ADNc sont répertoriées dans le tableau 2 ainsi que leurs gènes cibles.

Les RT-PCR classiques ont été réalisées avec l'enzyme Dreamtaq selon les recommandations du fournisseur (Fermentas), le nombre de cycle a été de 28x. Les amorces sont présentées dans le tableau 6.

La PCR quantitative en temps réel PCR (qPCR) a été effectuée sur la CFX96 (Biorad) avec des microplaques (Multiplate™ plaques 69-puits non jupée PCR, Low-Profil Biorad) recouverts d'un film Microseal'Bb'Adhesive joints (Biorad). Le mélange réactionnel est composé de 5 pM de SYBR Green Supermix (Biorad), 0,2 pM de chacune des paires d'amorces et 4 pM d'ADNc dilué à 1/10. Les conditions de qPCR sont : 30 sec à 95°C, 40 cycles de 5 secondes à 95°C et 30 secondes à 60°C. Pour vérifier l'absence de produits secondaires, les courbes de fusion ont été réalisées de 65 à 95 °C avec une augmentation de 0,5°C /sec. La quantité d'ARN a été normalisée à partir des transcriptions des gènes de ménage *hrdB* (Buttner et al. 1990) pour *Streptomyces* et *selR* (MHB_002629, (Deveau et al. 2014b)) pour *Pseudomonas*. Le gène *hrdB* code un facteur sigma majeur de *Streptomyces* et est utilisé en tant que contrôle interne pour quantifier l'expression relative de gènes cibles car il est exprimé de manière constante tout au long de la croissance. SelR a été défini, avec deux autres gènes, à partir d'une étude de microarray, comme étant un gène de ménage (accession number GSE38243 on the Gene Expression Omnibus at NCBI, (Deveau et al. 2014a)) Il a été choisi comme référence après avoir validé la stabilité de son expression dans les conditions testées. Le traitement des données a été réalisé avec le logiciel CFX96 manager (Biorad).

1.3. Tests de bioactivité

L'activité antibactérienne des souches de *S. ambofaciens* ATCC23877 a été testée par la méthode du recouvrement. Chaque culture ou coculture a été recouverte d'une solution de LB soft contenant des spores de la souche sensible *B. subtilis*, des cellules de *M. luteus* ou *E. coli*. Pour un volume de LB soft de 10 ml, 4 µl d'une solution de spores de *B. subtilis* à 10¹⁰ UFC/ ml est ajoutée ; 300 µl de *E. coli* d'une culture sur la nuit et *M. luteus* est inoculé à une DO₆₀₀ finale de 0,04. Les boîtes sont incubées à 30°C sur la nuit. La présence d'une activité antibactérienne se traduit par une zone d'inhibition de croissance de la souche sensible autour de la strie de *S. ambofaciens*.

1.4. Extraction de l'antibiotique

1.4.1. Extraction de l'antibiotique intracellulaire

Des cultures de *S. ambofaciens* ATCC 23877 seule ou en coculture avec *P. fluorescens* BBc6R8 ont été réalisées sur milieu R2 gélosé. *Streptomyces* est striée sur membrane de cellophane. Les stries ont été réalisées avec 2 µl de *S. ambofaciens* ATCC 23877 à 10⁷ UFC / ml et 2 µl de cellules de *Pseudomonas* à 10⁹ UFC / ml puis incubées à 26,5°C pendant 3 jours. Les stries ont ensuite été prélevées et resuspendues dans 500 µl du solvant acétate d'éthyle ou méthanol. L'ensemble a subi une sonication pendant 3 min à haute fréquence puis a été centrifugé à rpm puis filtré. Le surnageant a servi à la réalisation des tests de bioactivité.

1.4.2. Extraction de l'antibiotique à partir du milieu de culture

A partir des mêmes cultures réalisées précédemment, le milieu gélosé a été recouvert par du solvant acétate d'éthyle puis agité pendant 2h. Le liquide a ensuite été centrifugé à puis filtré et a servi à la réalisation des tests de bioactivité.

1.5. Construction d'un système rapporteur chez *S. ambofaciens* ATCC23877

1.5.1. Obtention du vecteur pIJ8660-pro-*alpV*

1.5.1.1. Clonage de l'insert pro-*alpV* dans le vecteur pGEM-T Easy

La région promotrice d'*alpV* (pro-*alpV*) est amplifiée par PCR en utilisant comme matrice l'ADNg de *S. ambofaciens* ATCC 23877. Cette amplification est réalisée avec l'enzyme haute fidélité Phusion qui génère des extrémités à bouts francs (utilisation selon les recommandations du fournisseur). Les amorces utilisées rap_proAlpV_F et rap_proalpV_R contiennent respectivement à leur extrémité 5' les sites de restriction *NdeI* et *NsiI*. Le produit d'amplification obtenu, nommé pro-*alpV*, est purifié à l'aide du kit « High Pure PCR Product Purification Kit » (Roche). Afin de permettre le clonage dans le vecteur pGEM-T Easy, un résidu adénine est ajouté à chaque extrémité de l'insert. Cette étape est réalisée selon les conditions recommandées par le fournisseur (Promega). Le produit est ensuite cloné dans le vecteur pGEM-T Easy. Les réactions de ligation des fragments d'ADN sont réalisées à l'aide de l'enzyme T4 DNA ligase (1 UE par µg d'ADN) sur la nuit à 16°C. La région promotrice d'*alpV* est insérée en amont du gène rapporteur *gfp*. Le produit de ligation obtenu est dialysé puis utilisé pour transformer des cellules compétentes *E. coli* DH5α par électroporation. La sélection des transformants est réalisée sur milieu gélosé LB contenant de l'ampicilline (100 µg/ml), de l'IPTG (0,5 mM) et du X-gal (80 µg/ml). Les clones dépourvus d'activité β-galactosidase (blancs) sont analysés pour leur contenu plasmidique. Le plasmide recombinant obtenu est nommé pGEM-T Easy-pro-*alpV*.

1.5.1.2. Clonage de l'insert pro-*alpV* dans le vecteur pIJ8660

Le plasmide pGEM-T Easy-pro-*alpV* a été digéré par les enzymes de restriction *NdeI* et *NsiI*. Après électrophorèse du fragment *NdeI/NsiI* correspondant à l'insert, ce dernier est purifié puis cloné dans le vecteur pIJ8660 (Sun et al. 1999) préalablement digéré par les mêmes enzymes de restriction et déphosphorylé par traitement à la phosphatase alcaline. L'enzyme est utilisée dans les conditions recommandées par le fournisseur (Biolabs). Le produit de ligation obtenu est dialysé puis est utilisé pour transformer des cellules compétentes *E. coli* DH5 α par électroporation. Les cellules sont ensuite étalées sur milieu gélosé LB contenant de l'apramycine (25 μ g/ml). Les transformants obtenus sont alors analysés pour leur contenu plasmidique. Le plasmide recombinant obtenu est nommé pIJ8680-pro-*alpV* (Figure 27).

Le clonage et l'intégrité de la séquence ont été vérifiés par séquençage.

1.5.2. Conjugaison chez *S. ambofaciens* ATCC 23877

Des cellules compétentes d'*E. coli* ET12567/pUZ8002 (utilisées pour la conjugaison vers *Streptomyces*) ont ensuite été transformées avec ce plasmide recombinant pIJ8680-pro-*alpV*. Les transformants obtenus sur milieu contenant kanamycine, chloramphénicol et apramycine sont analysés pour leur contenu plasmidique. Un de ses transformant servira ensuite à faire de la conjugaison chez *S. ambofaciens* ATCC 23877 (Kieser et al. 2000). Le plasmide pIJ8660 comporte le gène codant l'intégrase du phage ϕ C31 et le site attP, il pourra donc s'intégrer au niveau du site att du phage ϕ C31 du chromosome de *S. ambofaciens* ATCC 23877.

Les conjugants obtenus sont alors sélectionnés une première fois sur acide nalidixique pour contre sélectionner *E. coli* et sur apramycine puis un second tour de sélection a été réalisé sur milieu contenant seulement de l'apramycine.

Le témoin positif de l'expérience correspond à la souche *S. ambofaciens* dans laquelle la région promotrice d'un gène essentiel à la survie de la bactérie et exprimé de manière constitutive dans nos conditions de croissance (*hrdB*) a été insérée en amont du gène rapporteur. Le gène *hrdB* code le facteur sigma 70 essentiel. Les amorces utilisées sont présentées dans le tableau 4.

1.6. Analyses bioinformatiques

Les analyses *in silico* des séquences nucléotidiques et protéiques sont réalisées à l'aide du logiciel Artémis (<http://www.sanger.ac.uk/Software/Artemis/>). La base de données utilisée est Pubmed.

Les séquences, en acides aminés ou en nucléotides, sont alignées via le logiciel Bioedit (<http://www.mbio.ncsu.edu/BioEdit/bioedit.html>).

-Chapitre 5-

Références

Références

- Aigle B, Lautru S, Spiteller D, et al (2014) Genome mining of *Streptomyces ambofaciens*. *J Ind Microbiol Biotechnol* 41:251–263. doi: 10.1007/s10295-013-1379-y
- Aigle B, Pang X, Decaris B, Leblond P (2005) Involvement of AlpV, a New Member of the *Streptomyces* Antibiotic Regulatory Protein Family, in Regulation of the Duplicated Type II Polyketide Synthase alp Gene Cluster in *Streptomyces ambofaciens*. *J Bacteriol* 187:2491–2500. doi: 10.1128/JB.187.7.2491-2500.2005
- Ali NA, Jackson RM (1989) Stimulation of germination of spores of some ectomycorrhizal fungi by other micro-organisms. *Mycol Res* 93:182–186. doi: 10.1016/S0953-7562(89)80116-9
- Angell S, Bench BJ, Williams H, Watanabe CMH (2006) Pyocyanin Isolated from a Marine Microbial Population: Synergistic Production between Two Distinct Bacterial Species and Mode of Action. *Chem Biol* 13:1349–1359. doi: 10.1016/j.chembiol.2006.10.012
- Antony-Babu S, Deveau A, Van Nostrand JD, et al (2013) Black truffle-associated bacterial communities during the development and maturation of *Tuber melanosporum* ascocarps and putative functional roles. *Environ Microbiol* n/a–n/a. doi: 10.1111/1462-2920.12294
- Ariyo BT, Bucke C, Keshaverz T (1997) Alginate oligosaccharides as enhancers of penicillin production in cultures of *penicillium chrysogenum*. *Biotechnol Bioeng* 53:17–20. doi: 10.1002/(SICI)1097-0290(19970105)53:1<17::AID-BIT3>3.0.CO;2-1
- Asilonu E, Bucke C, Keshavarz T (2000) Enhancement of chrysogenin production in cultures of *Penicillium chrysogenum* by uronic acid oligosaccharides. *Biotechnol Lett* 22:931–936. doi: 10.1023/A:1005694415666
- Atkinson S, Williams P (2009) Quorum sensing and social networking in the microbial world. *J R Soc Interface* 6:959–978. doi: 10.1098/rsif.2009.0203
- Babić F, Venturi V, Maravić-Vlahoviček G (2010) Tobramycin at subinhibitory concentration inhibits the RhII/R quorum sensing system in a *Pseudomonas aeruginosa* environmental isolate. *BMC Infect Dis* 10:148. doi: 10.1186/1471-2334-10-148
- Bailey MJ, Lilley AK, Thompson IP, et al (1995) Site directed chromosomal marking of a fluorescent pseudomonad isolated from the phytosphere of sugar beet; stability and potential for marker gene transfer. *Mol Ecol* 4:755–763.
- Baldrian P, Kolařík M, Štursová M, et al (2012) Active and total microbial communities in forest soil are largely different and highly stratified during decomposition. *ISME J* 6:248–258. doi: 10.1038/ismej.2011.95
- Barea J-M, Azcón R, Azcón-Aguilar C (2002) Mycorrhizosphere interactions to improve plant fitness and soil quality. *Antonie Van Leeuwenhoek* 81:343–351. doi: 10.1023/A:1020588701325
- Barea J-M, Pozo MJ, Azcón R, Azcón-Aguilar C (2005) Microbial co-operation in the rhizosphere. *J Exp Bot* 56:1761–1778. doi: 10.1093/jxb/eri197
- Barelmann I, Fernández DU, Budzikiewicz H, Meyer J-M (2003) The pyoverdine from *Pseudomonas chlororaphis* D-TR133 showing mutual acceptance with the pyoverdine of *Pseudomonas fluorescens* CHA0. *BioMetals* 16:263–270.

- Barona-Gomez F, Lautru S, Francou F-X, et al (2006) Multiple biosynthetic and uptake systems mediate siderophore-dependent iron acquisition in *Streptomyces coelicolor* A3(2) and *Streptomyces ambofaciens* ATCC 23877. *Microbiology* 152:3355–3366. doi: 10.1099/mic.0.29161-0
- Barona-Gómez F, Wong U, Giannakopoulos AE, et al (2004) Identification of a Cluster of Genes that Directs Desferrioxamine Biosynthesis in *Streptomyces c oelicolor* M145. *J Am Chem Soc* 126:16282–16283. doi: 10.1021/ja045774k
- Barry SM, Challis GL (2009) Recent advances in siderophore biosynthesis. *Curr Opin Chem Biol* 13:205–215. doi: 10.1016/j.cbpa.2009.03.008
- Bauer R, Dicks LMT (2005) Mode of action of lipid II-targeting lantibiotics. *Int J Food Microbiol* 101:201–216. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2004.11.007
- Bäumler AJ, Hantke K (1992) Ferrioxamine uptake in *Yersinia enterocolitica*: characterization of the receptor protein FoxA. *Mol Microbiol* 6:1309–1321. doi: 10.1111/j.1365-2958.1992.tb00852.x
- Bentley SD, Chater KF, Cerdeno-Tarraga A-M, et al (2002) Complete genome sequence of the model actinomycete *Streptomyces coelicolor* A3 (2). *Nature* 417:141–147.
- Berner I, Winkelmann G (1990) Ferrioxamine transport mutants and the identification of the ferrioxamine receptor protein (FoxA) in *Erwinia herbicola* (*Enterobacter agglomerans*). *Biol Met* 2:197–202.
- Bodman SB von, Willey JM, Diggle SP (2008) Cell-Cell Communication in Bacteria: United We Stand. *J Bacteriol* 190:4377–4391. doi: 10.1128/JB.00486-08
- Boer W de, Folman LB, Summerbell RC, Boddy L (2005) Living in a fungal world: impact of fungi on soil bacterial niche development*. *FEMS Microbiol Rev* 29:795–811. doi: 10.1016/j.femsre.2004.11.005
- Branny P, Pearson JP, Pesci EC, et al (2001) Inhibition of Quorum Sensing by a *Pseudomonas aeruginosa* dksA Homologue. *J Bacteriol* 183:1531–1539. doi: 10.1128/JB.183.5.1531-1539.2001
- Brulé C, Frey-Klett P, Pierrat JC, et al (2001) Survival in the soil of the ectomycorrhizal fungus *Laccaria bicolor* and the effects of a mycorrhiza helper *Pseudomonas fluorescens*. *Soil Biol Biochem* 33:1683–1694. doi: 10.1016/S0038-0717(01)00090-6
- Bucca G, Brassington AME, Hotchkiss G, et al (2003) Negative feedback regulation of dnaK, clpB and lon expression by the DnaK chaperone machine in *Streptomyces coelicolor*, identified by transcriptome and in vivo DnaK-depletion analysis. *Mol Microbiol* 50:153–166. doi: 10.1046/j.1365-2958.2003.03696.x
- Bunet R, Mendes MV, Rouhier N, et al (2008) Regulation of the synthesis of the angucyclinone antibiotic alpomycin in *Streptomyces ambofaciens* by the autoregulator receptor AlpZ and its specific ligand. *J Bacteriol* 190:3293–3305. doi: 10.1128/JB.01989-07
- Bunet R, Song L, Mendes MV, et al (2011) Characterization and Manipulation of the Pathway-Specific Late Regulator AlpW Reveals *Streptomyces ambofaciens* as a New Producer of Kinamycins. *J Bacteriol* 193:1142–1153. doi: 10.1128/JB.01269-10

- Buttner MJ, Chater KF, Bibb MJ (1990) Cloning, disruption, and transcriptional analysis of three RNA polymerase sigma factor genes of *Streptomyces coelicolor* A3(2). *J Bacteriol* 172:3367–3378.
- Bystrykh LV, Fernández-Moreno MA, Herrema JK, et al (1996) Production of actinorhodin-related “blue pigments” by *Streptomyces coelicolor* A3 (2). *J Bacteriol* 178:2238–2244.
- Calvo AM, Wilson RA, Bok JW, Keller NP (2002) Relationship between Secondary Metabolism and Fungal Development. *Microbiol Mol Biol Rev* 66:447–459. doi: 10.1128/MMBR.66.3.447-459.2002
- Camilli A, Bassler BL (2006) Bacterial Small-Molecule Signaling Pathways. *Science* 311:1113–1116. doi: 10.1126/science.1121357
- Challis GL, Hopwood DA (2003) Synergy and contingency as driving forces for the evolution of multiple secondary metabolite production by *Streptomyces* species. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100 Suppl 2:14555–14561. doi: 10.1073/pnas.1934677100
- Champomier-Vergès M-C, Stintzi A, Meyer J-M (1996) Acquisition of iron by the non-siderophore-producing *Pseudomonas fragi*. *Microbiology* 142:1191–1199.
- Chen CW, Huang C-H, Lee H-H, et al (2002) Once the circle has been broken: dynamics and evolution of *Streptomyces* chromosomes. *Trends Genet* 18:522–529. doi: 10.1016/S0168-9525(02)02752-X
- Chu BC, Garcia-Herrero A, Johanson TH, et al (2010) Siderophore uptake in bacteria and the battle for iron with the host; a bird’s eye view. *BioMetals* 23:601–611. doi: 10.1007/s10534-010-9361-x
- Chun CK, Ozer EA, Welsh MJ, et al (2004) Inactivation of a *Pseudomonas aeruginosa* quorum-sensing signal by human airway epithelia. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101:3587–3590. doi: 10.1073/pnas.0308750101
- Claverys J-P, Håvarstein LS (2007) Cannibalism and fratricide: mechanisms and raisons d’être. *Nat Rev Microbiol* 5:219–229. doi: 10.1038/nrmicro1613
- Coisne S, Béchet M, Blondeau R (1999) Actinorhodin production by *Streptomyces coelicolor* A3(2) in iron-restricted media. *Lett Appl Microbiol* 28:199–202. doi: 10.1046/j.1365-2672.1999.00509.x
- Compeau G, Al-Achi BJ, Platsouka E, Levy SB (1988) Survival of rifampin-resistant mutants of *Pseudomonas fluorescens* and *Pseudomonas putida* in soil systems. *Appl Environ Microbiol* 54:2432–2438.
- Corbell N, Loper JE (1995) A global regulator of secondary metabolite production in *Pseudomonas fluorescens* Pf-5. *J Bacteriol* 177:6230–6236.
- Cornelis P (2010) Iron uptake and metabolism in pseudomonads. *Appl Microbiol Biotechnol* 86:1637–1645. doi: 10.1007/s00253-010-2550-2
- Cornelis P, Bodilis J (2009) A survey of TonB-dependent receptors in fluorescent pseudomonads. *Environ Microbiol Rep* 1:256–262. doi: 10.1111/j.1758-2229.2009.00041.x
- Cornelis P, Matthijs S (2002) Diversity of siderophore-mediated iron uptake systems in fluorescent pseudomonads: not only pyoverdines. *Environ Microbiol* 4:787–798.

- Corre C, Song L, O'Rourke S, et al (2008) 2-Alkyl-4-hydroxymethylfuran-3-carboxylic acids, antibiotic production inducers discovered by *Streptomyces coelicolor* genome mining. *Proc Natl Acad Sci* 105:17510–17515. doi: 10.1073/pnas.0805530105
- Currie CR, Scott JA, Summerbell RC, Malloch D (1999) Fungus-growing ants use antibiotic-producing bacteria to control garden parasites. *Nature* 398:701–704. doi: 10.1038/19519
- D'Onofrio A, Crawford JM, Stewart EJ, et al (2010) Siderophores from Neighboring Organisms Promote the Growth of Uncultured Bacteria. *Chem Biol* 17:254–264. doi: 10.1016/j.chembiol.2010.02.010
- Davelos AL, Kinkel LL, Samac DA (2004) Spatial Variation in Frequency and Intensity of Antibiotic Interactions among Streptomyces from Prairie Soil. *Appl Environ Microbiol* 70:1051–1058. doi: 10.1128/AEM.70.2.1051-1058.2004
- Davies J (2013) Specialized microbial metabolites: functions and origins. *J Antibiot Tokyo* 66:361–4. doi: 10.1038/ja.2013.61
- Davies J (2006) Are antibiotics naturally antibiotics? *J Ind Microbiol Biotechnol* 33:496–499. doi: 10.1007/s10295-006-0112-5
- De Werra P, Pechy-Tarr M, Keel C, Maurhofer M (2009) Role of gluconic acid production in the regulation of biocontrol traits of *Pseudomonas fluorescens* CHA0. *Appl Env Microbiol* 75:4162–74. doi: 10.1128/AEM.00295-09
- Deiss K, Hantke K, Winkelmann G (1998) Molecular recognition of siderophores: A study with cloned ferrioxamine receptors (FoxA) from *Erwinia herbicola* and *Yersinia enterocolitica*. *Biometals* 11:131–137. doi: 10.1023/A:1009230012577
- Delalande L (2002) Implication de la voie oxydative du glucose et de l'induction de résistance systémique dans l'antagonisme de *Pseudomonas fluorescens* Pf29A vis à vis de *Gaeumannomyces graminis* var. *Triciti*, l'agent du piétin-échaudage du blé. Paris 11, Orsay
- Delalande L, Faure D, Raffoux A, et al (2005) N-hexanoyl-L-homoserine lactone, a mediator of bacterial quorum-sensing regulation, exhibits plant-dependent stability and may be inactivated by germinating *Lotus corniculatus* seedlings. *FEMS Microbiol Ecol* 52:13–20. doi: 10.1016/j.femsec.2004.10.005
- Dellagi A, Reis D, Vian B, Expert D (1999) Expression of the Ferrioxamine Receptor Gene of *Erwinia amylovora* CFBP 1430 During Pathogenesis. *Mol Plant Microbe Interact* 12:463–466. doi: 10.1094/MPMI.1999.12.5.463
- Deng W-L, Huang H-C (1999) Cellular Locations of *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* HrcC and HrcJ Proteins, Required for Harpin Secretion via the Type III Pathway. *J Bacteriol* 181:2298–2301.
- Deveau A, Barret M, Diedhiou AG, et al (2014a) Pairwise transcriptomic analysis of the interactions between the ectomycorrhizal fungus *Laccaria bicolor* S238N and three beneficial, neutral and antagonistic soil bacteria.
- Deveau A, Brulé C, Palin B, et al (2010) Role of fungal trehalose and bacterial thiamine in the improved survival and growth of the ectomycorrhizal fungus *Laccaria bicolor* S238N and the helper bacterium *Pseudomonas fluorescens* BBc6R8: Role of trehalose and thiamine in mutualistic interaction. *Environ Microbiol Rep* 2:560–568. doi: 10.1111/j.1758-2229.2010.00145.x

- Deveau A, Garbaye J, Frey-Klett P (2008) Des bactéries à la rescousse des champignons symbiotiques. *Biofutur* 34–37.
- Deveau A, Gross H, Morin E, et al (2014b) Genome Sequence of the Mycorrhizal Helper Bacterium *Pseudomonas fluorescens* BBc6R8. *Genome Announc* 2:e01152–13. doi: 10.1128/genomeA.01152-13
- Dietrich LEP, Price-Whelan A, Petersen A, et al (2006) The phenazine pyocyanin is a terminal signalling factor in the quorum sensing network of *Pseudomonas aeruginosa*. *Mol Microbiol* 61:1308–1321. doi: 10.1111/j.1365-2958.2006.05306.x
- Dietrich LEP, Teal TK, Price-Whelan A, Newman DK (2008) Redox-Active Antibiotics Control Gene Expression and Community Behavior in Divergent Bacteria. *Science* 321:1203–1206. doi: 10.1126/science.1160619
- Dimkpa CO, Svatos A, Dabrowska P, et al (2008) Involvement of siderophores in the reduction of metal-induced inhibition of auxin synthesis in *Streptomyces* spp. *Chemosphere* 74:19–25. doi: 10.1016/j.chemosphere.2008.09.079
- Dommergues Y, Mangenot F (1970) *Ecologie microbienne du sol*. Masson, Paris
- Dong YH, Wang LH, Xu JL, et al (2001) Quenching quorum-sensing-dependent bacterial infection by an N-acyl homoserine lactonase. *Nature* 411:813–817. doi: 10.1038/35081101
- Dong Y-H, Zhang L-H (2005) Quorum sensing and quorum-quenching enzymes. *J Microbiol* 43:101–109.
- Duhme A-K, Hider RC, Naldrett MJ, Pau RN (1998) The stability of the molybdenum-azotochelin complex and its effect on siderophore production in *Azotobacter vinelandii*. *JBIC J Biol Inorg Chem* 3:520–526. doi: 10.1007/s007750050263
- Dumas Z, Ross-Gillespie A, Kummerli R (2013) Switching between apparently redundant iron-uptake mechanisms benefits bacteria in changeable environments. *Proc R Soc B Biol Sci* 280:20131055–20131055. doi: 10.1098/rspb.2013.1055
- Eberl L, Winson MK, Sternberg C, et al (1996) Involvement of N-acyl-L-homoserine lactone autoinducers in controlling the multicellular behaviour of *Serratia liquefaciens*. *Mol Microbiol* 20:127–136. doi: 10.1111/j.1365-2958.1996.tb02495.x
- Eckburg PB, Bik EM, Bernstein CN, et al (2005) Diversity of the Human Intestinal Microbial Flora. *Science* 308:1635–1638. doi: 10.1126/science.1110591
- Effmert U, Kalderás J, Warnke R, Piechulla B (2012) Volatile Mediated Interactions Between Bacteria and Fungi in the Soil. *J Chem Ecol* 38:665–703. doi: 10.1007/s10886-012-0135-5
- Eisenberg RC, Butters SJ, Quay SC, Friedman SB (1974) Glucose uptake and phosphorylation in *Pseudomonas fluorescens*. *J Bacteriol* 120:147–153.
- Ellermeier CD, Hobbs EC, Gonzalez-Pastor JE, Losick R (2006) A Three-Protein Signaling Pathway Governing Immunity to a Bacterial Cannibalism Toxin. *Cell* 124:549–559. doi: 10.1016/j.cell.2005.11.041
- Escolar L, Pérez-Martín J, de Lorenzo V (1999) Opening the iron box: transcriptional metalloregulation by the Fur protein. *J Bacteriol* 181:6223–6229.

- Essén SA, Johnsson A, Bylund D, et al (2007a) Siderophore Production by *Pseudomonas stutzeri* under Aerobic and Anaerobic Conditions. *Appl Environ Microbiol* 73:5857–5864. doi: 10.1128/AEM.00072-07
- Essén SA, Johnsson A, Bylund D, et al (2007b) Siderophore Production by *Pseudomonas stutzeri* under Aerobic and Anaerobic Conditions. *Appl Environ Microbiol* 73:5857–5864. doi: 10.1128/AEM.00072-07
- Eto D, Watanabe K, Saeki H, et al (2013) Divergent effects of desferrioxamine on bacterial growth and characteristics. *J Antibiot (Tokyo)* 66:199–203. doi: 10.1038/ja.2012.111
- Frag MA, Zhang H, Ryu C-M (2013) Dynamic Chemical Communication between Plants and Bacteria through Airborne Signals: Induced Resistance by Bacterial Volatiles. *J Chem Ecol* 39:1007–1018. doi: 10.1007/s10886-013-0317-9
- Faure D, Dessaux Y (2007) Quorum sensing as a target for developing control strategies for the plant pathogen *Pectobacterium*. *Eur J Plant Pathol* 119:353–365. doi: 10.1007/s10658-007-9149-1
- Faure D, Vereecke D, Leveau JHJ (2009) Molecular communication in the rhizosphere. *Plant Soil* 321:279–303. doi: 10.1007/s11104-008-9839-2
- Faurie C (2002) *ÉCOLOGIE : APPROCHE SCIENTIFIQUE ET PRATIQUE*, Édition : 5e éd. Tec & Doc Lavoisier, Londres; Paris
- Feil H, Feil WS, Chain P, et al (2005) Comparison of the complete genome sequences of *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* B728a and pv. *tomato* DC3000. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102:11064–11069. doi: 10.1073/pnas.0504930102
- Fender JE, Bender CM, Stella NA, et al (2012) *Serratia marcescens* Quinoprotein Glucose Dehydrogenase Activity Mediates Medium Acidification and Inhibition of Prodigiosin Production by Glucose. *Appl Environ Microbiol* 78:6225–6235. doi: 10.1128/AEM.01778-12
- Fernández-Martínez LT, Sol RD, Evans MC, et al (2011) A transposon insertion single-gene knockout library and new ordered cosmid library for the model organism *Streptomyces coelicolor* A3(2). *Antonie Van Leeuwenhoek* 99:515–522. doi: 10.1007/s10482-010-9518-1
- Filion M, St-Arnaud M, Fortin JA (1999) Direct interaction between the arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus intraradices* and different rhizosphere microorganisms. *New Phytol* 141:525–533. doi: 10.1046/j.1469-8137.1999.00366.x
- Flardh K, Buttner MJ (2009) *Streptomyces* morphogenetics: dissecting differentiation in a filamentous bacterium. *Nat Rev Microbiol* 7:36–49. doi: 10.1038/nrmicro1968
- Floriano B, Bibb M (1996) *afsR* is a pleiotropic but conditionally required regulatory gene for antibiotic production in *Streptomyces coelicolor* A3(2). *Mol Microbiol* 21:385–396.
- Frankenberger WT Jr, Muhammad Arshad (1995) *Phytohormones in soils: microbial production and function*. viii + 503 pp.
- Frey P, Frey-Klett P, Garbaye J, et al (1997) Metabolic and Genotypic Fingerprinting of Fluorescent *Pseudomonads* Associated with the Douglas Fir-*Laccaria bicolor* Mycorrhizosphere. *Appl Environ Microbiol* 63:1852–1860.

- Frey-Klett P, Chavatte M, Clausse M-L, et al (2005) Ectomycorrhizal symbiosis affects functional diversity of rhizosphere fluorescent pseudomonads. *New Phytol* 165:317–328. doi: 10.1111/j.1469-8137.2004.01212.x
- Frey-Klett P, Garbaye J, Tarkka M (2007) The mycorrhiza helper bacteria revisited. *New Phytol* 176:22–36. doi: 10.1111/j.1469-8137.2007.02191.x
- Frey-Klett P, Pierrat JC, Garbaye J (1997) Location and Survival of Mycorrhiza Helper *Pseudomonas fluorescens* during Establishment of Ectomycorrhizal Symbiosis between *Laccaria bicolor* and Douglas Fir. *Appl Environ Microbiol* 63:139–144.
- Funahashi T, Tanabe T, Miyamoto K, et al (2012) Characterization of a gene encoding the outer membrane receptor for ferric enterobactin in *Aeromonas hydrophila* ATCC 7966(T). *Biosci Biotechnol Biochem* 77:353–360.
- Fuqua WC, Winans SC, Greenberg EP (1994) Quorum sensing in bacteria: the LuxR-LuxI family of cell density-responsive transcriptional regulators. *J Bacteriol* 176:269–275.
- Galet J, Deveau A, Hôtel L, et al (2015) *Pseudomonas fluorescens* pirates both ferrioxamine and ferri-coelichelin siderophores from *Streptomyces ambofaciens*. *Appl Environ Microbiol* AEM.03520–14. doi: 10.1128/AEM.03520-14
- Galet J, Deveau A, Hôtel L, et al (2014) Gluconic acid-producing *Pseudomonas* sp. prevent γ -actinorhodin biosynthesis by *Streptomyces coelicolor* A3(2). *Arch Microbiol* 1–9. doi: 10.1007/s00203-014-1000-4
- Garbaye J (1994) Tansley Review No. 76 Helper bacteria: a new dimension to the mycorrhizal symbiosis. *New Phytol* 128:197–210. doi: 10.1111/j.1469-8137.1994.tb04003.x
- Garbeva P, Hordijk C, Gerards S, de Boer W (2014) Volatiles produced by the mycophagous soil bacterium *Collimonas*. *FEMS Microbiol Ecol* 87:639–649. doi: 10.1111/1574-6941.12252
- Geng J, Yu S-B, Wan X, et al (2008) Protective action of bacterial melanin against DNA damage in full UV spectrums by a sensitive plasmid-based noncellular system. *J Biochem Biophys Methods* 70:1151–1155. doi: 10.1016/j.jprot.2007.12.013
- Giron D, Frago E, Glevarec G, et al (2013) Cytokinins as key regulators in plant-microbe-insect interactions: connecting plant growth and defence. *Funct Ecol* 27:599–609. doi: 10.1111/1365-2435.12042
- Gliese N, Khodaverdi V, Görisch H (2010) The PQQ biosynthetic operons and their transcriptional regulation in *Pseudomonas aeruginosa*. *Arch Microbiol* 192:1–14. doi: 10.1007/s00203-009-0523-6
- Gobat J-M, Aragno M, Matthey W (2010) *Le sol vivant: bases de pédologie, biologie des sols*. PPUR Presses polytechniques
- Goh E-B, Yim G, Tsui W, et al (2002) Transcriptional modulation of bacterial gene expression by subinhibitory concentrations of antibiotics. *Proc Natl Acad Sci* 99:17025–17030. doi: 10.1073/pnas.252607699
- Goodier RI, Ahmer BMM (2001) SirA orthologs affect both motility and virulence. *J Bacteriol* 183:2249–2258. doi: 10.1128/JB.183.7.2249-2258.2001
- Gould SJ (1997) Biosynthesis of the Kinamycins. *Chem Rev* 97:2499–2509.

- Gramajo HC, Takano E, Bibb MJ (1993) Stationary-phase production of the antibiotic actinorhodin in *Streptomyces coelicolor* A3(2) is transcriptionally regulated. *Mol Microbiol* 7:837–845. doi: 10.1111/j.1365-2958.1993.tb01174.x
- Greenberg EP (2000) Acyl-homoserine lactone quorum sensing in bacteria. *J Microbiol-SEOUL* 38:117–121.
- Gross H, Stockwell VO, Henkels MD, et al (2007) The genomisotopic approach: A systematic method to isolate products of orphan biosynthetic gene clusters. *Chem Biol* 14:53–63. doi: 10.1016/j.chembiol.2006.11.007
- Haas D, Défago G (2005) Biological control of soil-borne pathogens by fluorescent pseudomonads. *Nat Rev Microbiol* 3:307–319. doi: 10.1038/nrmicro1129
- Hanahan D (1983) Studies on Transformation of *Escherichia coli* with Plasmids. *J Mol Biol* 166:557–580.
- Hannauer M, Barda Y, Mislin GLA, et al (2010) The Ferrichrome Uptake Pathway in *Pseudomonas aeruginosa* Involves an Iron Release Mechanism with Acylation of the Siderophore and Recycling of the Modified Desferrichrome. <http://jb.asm.org>. Accessed 15 May 2014
- Hantke K (2001) Iron and metal regulation in bacteria. *Curr Opin Microbiol* 4:172–177. doi: 10.1016/S1369-5274(00)00184-3
- Hartney SL, Mazurier S, Girard MK, et al (2012) Ferric-Pyoverdine Recognition by Fpv Outer Membrane Proteins of *Pseudomonas protegens* Pf-5. *J Bacteriol* 195:765–776. doi: 10.1128/JB.01639-12
- Hartney SL, Mazurier S, Kidarsa TA, et al (2011) TonB-dependent outer-membrane proteins and siderophore utilization in *Pseudomonas fluorescens* Pf-5. *BioMetals* 24:193–213. doi: 10.1007/s10534-010-9385-2
- Heddi A (2009) bactéries symbiotiques. *Biofutur* 299:36.
- Henry E (2013) *Les Sols Forestiers - Primary Source Edition*. Nabu Press
- Hentzer M, Givskov M (2003) Pharmacological inhibition of quorum sensing for the treatment of chronic bacterial infections. *J Clin Invest* 112:1300–1307. doi: 10.1172/JCI200320074
- Hentzer M, Riedel K, Rasmussen TB, et al (2002) Inhibition of quorum sensing in *Pseudomonas aeruginosa* biofilm bacteria by a halogenated furanone compound. *Microbiol-Sgm* 148:87–102.
- Herron PR, Wellington EMH (1990) New Method for Extraction of Streptomycete Spores from Soil and Application to the Study of Lysogeny in Sterile Amended and Nonsterile Soil. *Appl Environ Microbiol* 56:1406–1412.
- Hersman L, Lloyd T, Sposito G (1995) Siderophore-promoted dissolution of hematite. *Geochim Cosmochim Acta* 59:3327–3330. doi: 10.1016/0016-7037(95)00221-K
- Hesketh AR, Chandra G, Shaw AD, et al (2002) Primary and secondary metabolism, and post-translational protein modifications, as portrayed by proteomic analysis of *Streptomyces coelicolor*. *Mol Microbiol* 46:917–932. doi: 10.1046/j.1365-2958.2002.03219.x

- Hider RC, Kong X (2010) Chemistry and biology of siderophores. *Nat Prod Rep* 27:637. doi: 10.1039/b906679a
- Hoffman LR, D'Argenio DA, MacCoss MJ, et al (2005) Aminoglycoside antibiotics induce bacterial biofilm formation. *Nature* 436:1171–1175. doi: 10.1038/nature03912
- Holloway BW (1955) Genetic Recombination in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Gen Microbiol* 13:572–581. doi: 10.1099/00221287-13-3-572
- Holtsmark I, Eijsink VGH, Brurberg MB (2008) Bacteriocins from plant pathogenic bacteria. *FEMS Microbiol Lett* 280:1–7. doi: 10.1111/j.1574-6968.2007.01010.x
- Honda NH, Kimura S, Tateda K, et al (2011) Roles of *Pseudomonas aeruginosa* Autoinducers and their Degradation Products, Tetramic acids, in Bacterial Survival and Behavior in Ecological Niches. *Microbes Environ* 26:160–164. doi: 10.1264/jsme2.ME10198
- Hopwood DA (1999) Forty years of genetics with *Streptomyces*: from in vivo through in vitro to in silico. *Microbiology* 145:2183–2202.
- Hopwood DA, Chater KF, Bibb MJ (1995) Genetics of antibiotic production in *Streptomyces coelicolor* A3(2), a model streptomycete. *Biotechnol Read Mass* 28:65–102.
- Horinouchi S (2007) Mining and polishing of the treasure trove in the bacterial genus *Streptomyces*. *Biosci Biotechnol Biochem* 71:283–299.
- Huang J, Lih C-J, Pan K-H, Cohen SN (2001) Global analysis of growth phase responsive gene expression and regulation of antibiotic biosynthetic pathways in *Streptomyces coelicolor* using DNA microarrays. *Genes Dev* 15:3183–3192. doi: 10.1101/gad.943401
- Huang JJ, Han J-I, Zhang L-H, Leadbetter JR (2003) Utilization of Acyl-Homoserine Lactone Quorum Signals for Growth by a Soil *Pseudomonad* and *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. *Appl Environ Microbiol* 69:5941–5949. doi: 10.1128/AEM.69.10.5941-5949.2003
- Hungate RE (1966) *The rumen and its microbes*. x+533 pp.
- Hussein KA, Joo JH (2014) Potential of Siderophore Production by Bacteria Isolated from Heavy Metal: Polluted and Rhizosphere Soils. *Curr Microbiol* 68:717–723. doi: 10.1007/s00284-014-0530-y
- Jalili F, Khavazi K, Pazira E, et al (2009) Isolation and characterization of ACC deaminase-producing fluorescent pseudomonads, to alleviate salinity stress on canola (*Brassica napus* L.) growth. *J Plant Physiol* 166:667–674. doi: 10.1016/j.jplph.2008.08.004
- Janssen PH (2006) Identifying the Dominant Soil Bacterial Taxa in Libraries of 16S rRNA and 16S rRNA Genes. *Appl Environ Microbiol* 72:1719–1728. doi: 10.1128/AEM.72.3.1719-1728.2006
- Jenifer MA, Reena A, Aysha OS, et al (2013) Original Research Article Isolation of siderophore producing bacteria from rhizosphere soil and their antagonistic activity against selected fungal plant pathogens. *Int J Curr Microbiol App Sci* 2:59–65.
- Johansson JF, Paul LR, Finlay RD (2004) Microbial interactions in the mycorrhizosphere and their significance for sustainable agriculture. *FEMS Microbiol Ecol* 48:1–13. doi: 10.1016/j.femsec.2003.11.012

- Joshi F, Archana G, Desai A (2006) Siderophore Cross-Utilization Amongst Rhizospheric Bacteria and the Role of Their Differential Affinities for Fe³⁺ on Growth Stimulation Under Iron-Limited Conditions. *Curr Microbiol* 53:141–147. doi: 10.1007/s00284-005-0400-8
- Jousset A, Rochat L, Scheu S, et al (2010) Predator-Prey Chemical Warfare Determines the Expression of Biocontrol Genes by Rhizosphere-Associated *Pseudomonas fluorescens*. *Appl Environ Microbiol* 76:5263–5268. doi: 10.1128/AEM.02941-09
- Jude F, Köhler T, Branny P, et al (2003) Posttranscriptional Control of Quorum-Sensing-Dependent Virulence Genes by DksA in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol* 185:3558–3566. doi: 10.1128/JB.185.12.3558-3566.2003
- Juguet M, Lautru S, Francou F-X, et al (2009) An Iterative Nonribosomal Peptide Synthetase Assembles the Pyrrole-Amide Antibiotic Congocidine in *Streptomyces ambofaciens*. *Chem Biol* 16:421–431. doi: 10.1016/j.chembiol.2009.03.010
- Julia Pedroza C, Mauricio Florez A, Ruiz OS, Orduz S (2014) Enzymatic hydrolysis of molecules associated with bacterial quorum sensing using an acyl homoserine lactonase from a novel *Bacillus thuringiensis* strain. *Antonie Van Leeuwenhoek Int J Gen Mol Microbiol* 105:253–264. doi: 10.1007/s10482-013-0072-5
- Kadi N, Oves-Costales D, Barona-Gomez F, Challis GL (2007) A new family of ATP-dependent oligomerization-macrocyclization biocatalysts. *Nat Chem Biol* 3:652–656. doi: 10.1038/nchembio.2007.23
- Kaiser W, Huguet E, Casas J, et al (2010) Plant green-island phenotype induced by leaf-miners is mediated by bacterial symbionts. *Proc R Soc B Biol Sci* 277:2311–2319. doi: 10.1098/rspb.2010.0214
- Kaltenpoth M, Göttler W, Herzner G, Strohm E (2005) Symbiotic Bacteria Protect Wasp Larvae from Fungal Infestation. *Curr Biol* 15:475–479. doi: 10.1016/j.cub.2004.12.084
- Kamilova F, Kravchenko LV, Shaposhnikov AI, et al (2006) Organic acids, sugars, and L-tryptophane in exudates of vegetables growing on stonewool and their effects on activities of rhizosphere bacteria. *Mol Plant-Microbe Interact* MPMI 19:250–256. doi: 10.1094/MPMI-19-0250
- Karray F, Darbon E, Oestreicher N, et al (2007) Organization of the biosynthetic gene cluster for the macrolide antibiotic spiramycin in *Streptomyces ambofaciens*. *Microbiology* 153:4111–4122. doi: 10.1099/mic.0.2007/009746-0
- Kato J, Funa N, Watanabe H, et al (2007) Biosynthesis of gamma-butyrolactone autoregulators that switch on secondary metabolism and morphological development in *Streptomyces*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104:2378–2383. doi: 10.1073/pnas.0607472104
- Kaufmann GF, Sartorio R, Lee S-H, et al (2005) Revisiting quorum sensing: Discovery of additional chemical and biological functions for 3-oxo-N-acylhomoserine lactones. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102:309–314. doi: 10.1073/pnas.0408639102
- Kaur R, Macleod J, Foley W, Nayudu M (2006) Gluconic acid: An antifungal agent produced by *Pseudomonas* species in biological control of take-all. *Phytochemistry* 67:595–604. doi: 10.1016/j.phytochem.2005.12.011
- Khalid A, Arshad M, Zahir Z a. (2004) Screening plant growth-promoting rhizobacteria for improving growth and yield of wheat. *J Appl Microbiol* 96:473–480. doi: 10.1046/j.1365-2672.2003.02161.x

- Khokhlov A, Li T, Ln B, et al (1966) [The A-factor, responsible for streptomycin biosynthesis by mutant strains of *Actinomyces streptomycini*]. Dokl Akad Nauk SSSR 177:232–235.
- Kieser T, Bibb MJ, Buttner MJ, et al (2000) Practical *Streptomyces* Genetics. John Innes
- Kim K, Lee S, Ryu C-M (2013) Interspecific bacterial sensing through airborne signals modulates locomotion and drug resistance. Nat Commun 4:1809. doi: 10.1038/ncomms2789
- Kim Y, Bae B, Choung Y (2005) Optimization of biological phosphorus removal from contaminated sediments with phosphate-solubilizing microorganisms. J Biosci Bioeng 99:23–29. doi: 10.1263/jbb.99.23
- Kimura S, Tateda K, Ishii Y, et al (2009) *Pseudomonas aeruginosa* Las quorum sensing autoinducer suppresses growth and biofilm production in *Legionella* species. Microbiology 155:1934–1939. doi: 10.1099/mic.0.026641-0
- Kingsley RA, Reissbrodt R, Rabsch W, et al (1999) Ferrioxamine-Mediated Iron(III) Utilization by *Salmonella enterica*. Appl Environ Microbiol 65:1610–1618.
- Kinkel LL, Schlatter DC, Bakker MG, Arenz BE (2012) *Streptomyces* competition and co-evolution in relation to plant disease suppression. Res Microbiol 163:490–499. doi: 10.1016/j.resmic.2012.07.005
- Kitani S, Doi M, Shimizu T, et al (2010) Control of secondary metabolism by farX, which is involved in the γ -butyrolactone biosynthesis of *Streptomyces lavendulae* FRI-5. Arch Microbiol 192:211–220. doi: 10.1007/s00203-010-0550-3
- Kitani S, Kinoshita H, Nihira T, Yamada Y (1999) In Vitro Analysis of the Butyrolactone Autoregulator Receptor Protein (FarA) of *Streptomyces lavendulae* FRI-5 Reveals that FarA Acts as a DNA-Binding Transcriptional Regulator That Controls Its Own Synthesis. J Bacteriol 181:5081–5084.
- Kloepper JW, Beauchamp CJ (1992) A review of issues related to measuring colonization of plant roots by bacteria. Can J Microbiol 38:1219–1232. doi: 10.1139/m92-202
- Kloepper JW, Scher FM, Laliberté M, Tipping B (1986) Emergence-Promoting Rhizobacteria: Description and Implications for Agriculture. In: Swinburne TR (ed) Iron, Siderophores, and Plant Diseases. Springer US, pp 155–164
- Koh C-L, Sam C-K, Yin W-F, et al (2013) Plant-Derived Natural Products as Sources of Anti-Quorum Sensing Compounds. Sensors 13:6217–6228. doi: 10.3390/s130506217
- Kolter R, Siegele DA, Tormo A (1993) The Stationary Phase of The Bacterial Life Cycle. Annu Rev Microbiol 47:855–874. doi: 10.1146/annurev.mi.47.100193.004231
- Komatsu M, Uchiyama T, Ōmura S, et al (2010) Genome-minimized *Streptomyces* host for the heterologous expression of secondary metabolism. Proc Natl Acad Sci 107:2646–2651. doi: 10.1073/pnas.0914833107
- Konovalova A, Sjøgaard-Andersen L (2011) Close encounters: contact-dependent interactions in bacteria. Mol Microbiol 81:297–301. doi: 10.1111/j.1365-2958.2011.07711.x
- Kraemer SM (2004) Iron oxide dissolution and solubility in the presence of siderophores. Aquat Sci - Res Boundaries 66:3–18. doi: 10.1007/s00027-003-0690-5

- Kraus J, Loper JE (1992) Lack of evidence for a role of antifungal metabolite production by *Pseudomonas fluorescens* Pf-5 in biological control of *Pythium* damping-off of cucumber. *Phytopathology* 82:264–271.
- Kumbhar C, Mudliar P, Bhatia L, et al (2014) Widespread predatory abilities in the genus *Streptomyces*. *Arch Microbiol* 196:235–248. doi: 10.1007/s00203-014-0961-7
- Lambert S, Traxler MF, Craig M, et al (2014) Altered desferrioxamine-mediated iron utilization is a common trait of bald mutants of *Streptomyces coelicolor*. *Metallomics*. doi: 10.1039/c4mt00068d
- Laureti L, Song L, Huang S, et al (2011) Identification of a bioactive 51-membered macrolide complex by activation of a silent polyketide synthase in *Streptomyces ambofaciens*. *Proc Natl Acad Sci* 108:6258–6263. doi: 10.1073/pnas.1019077108
- Lautru S, Deeth RJ, Bailey LM, Challis GL (2005) Discovery of a new peptide natural product by *Streptomyces coelicolor* genome mining. *Nat Chem Biol* 1:265–269. doi: 10.1038/nchembio731
- Laville J, Voisard C, Keel C, et al (1992) Global control in *Pseudomonas fluorescens* mediating antibiotic synthesis and suppression of black root rot of tobacco. *Proc Natl Acad Sci* 89:1562–1566. doi: 10.1073/pnas.89.5.1562
- Leblond P, Fischer G, Francou F-X, et al (1996) The unstable region of *Streptomyces ambofaciens* includes 210 kb terminal inverted repeats flanking the extremities of the linear chromosomal DNA. *Mol Microbiol* 19:261–271. doi: 10.1046/j.1365-2958.1996.366894.x
- Lee J, Jayaraman A, Wood TK (2007) Indole is an inter-species biofilm signal mediated by SdiA. *BMC Microbiol* 7:42. doi: 10.1186/1471-2180-7-42
- Létoffé S, Audrain B, Bernier SP, et al (2014) Aerial Exposure to the Bacterial Volatile Compound Trimethylamine Modifies Antibiotic Resistance of Physically Separated Bacteria by Raising Culture Medium pH. *mBio* 5:e00944–13. doi: 10.1128/mBio.00944-13
- Li XZ, Nikaido H, Williams KE (1997) Silver-resistant mutants of *Escherichia coli* display active efflux of Ag⁺ and are deficient in porins. *J Bacteriol* 179:6127–6132.
- Lin JT, Connelly MB, Amolo C, et al (2005) Global Transcriptional Response of *Bacillus subtilis* to Treatment with Subinhibitory Concentrations of Antibiotics That Inhibit Protein Synthesis. *Antimicrob Agents Chemother* 49:1915–1926. doi: 10.1128/AAC.49.5.1915-1926.2005
- Linares JF, Gustafsson I, Baquero F, Martinez JL (2006) Antibiotics as intermicrobial signaling agents instead of weapons. *Proc Natl Acad Sci USA* 103:19484–19489. doi: 10.1073/pnas.0608949103
- Llamas MA, Sparrius M, Kloet R, et al (2006) The Heterologous Siderophores Ferrioxamine B and Ferrichrome Activate Signaling Pathways in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol* 188:1882–1891. doi: 10.1128/JB.188.5.1882-1891.2006
- Loper JE, Hassan KA, Mavrodi DV, et al (2012) Comparative Genomics of Plant-Associated *Pseudomonas* spp.: Insights into Diversity and Inheritance of Traits Involved in Multitrophic Interactions. *PLoS Genet* 8:e1002784. doi: 10.1371/journal.pgen.1002784
- Loper JE, Henkels MD (1999) Utilization of heterologous siderophores enhances levels of iron available to *Pseudomonas putida* in the rhizosphere. *Appl Environ Microbiol* 65:5357–5363.

- Loper JE, Paulson I, Bruck D, et al (2008) Genomics of secondary metabolite production by *Pseudomonas fluorescens* Pf-5. *PHYTOPATHOLOGY* 98:S94–S94.
- Luckey M, Pollack JR, Wayne R, et al (1972) Iron Uptake in *Salmonella typhimurium*: Utilization of Exogenous Siderochromes as Iron Carriers. *J Bacteriol* 111:731–738.
- Luti KJK, Mavituna F (2010) *Streptomyces coelicolor* increases the production of undecylprodigiosin when interacted with *Bacillus subtilis*. *Biotechnol Lett* 33:113–118. doi: 10.1007/s10529-010-0401-y
- Madigan M, Martinko J, Prieur D (2012) Brock, *Biologie des micro-organismes*.
- Mah T-F, Pitts B, Pellock B, et al (2003) A genetic basis for *Pseudomonas aeruginosa* biofilm antibiotic resistance. *Nature* 426:306–310. doi: 10.1038/nature02122
- Martinez JS, Haygood MG, Butler A (2001) Identification of a natural desferrioxamine siderophore produced by a marine bacterium. *Limnol Oceanogr* 46:420–424.
- Matthijs S, Laus G, Meyer J-M, et al (2009) Siderophore-mediated iron acquisition in the entomopathogenic bacterium *Pseudomonas entomophila* L48 and its close relative *Pseudomonas putida* KT2440. *BioMetals* 22:951–964. doi: 10.1007/s10534-009-9247-y
- McVittie A, Messik F, Zahler SA (1962) Developmental Biology of *Myxococcus*. *J Bacteriol* 84:546–551.
- Meiwes J, Fiedler H-P, Zähler H, et al (1990) Production of desferrioxamine E and new analogues by directed fermentation and feeding fermentation. *Appl Microbiol Biotechnol* 32:505–510. doi: 10.1007/BF00173718
- Miethke M, Kraushaar T, Marahiel MA (2013) Uptake of xenosiderophores in *Bacillus subtilis* occurs with high affinity and enhances the folding stabilities of substrate binding proteins. *FEBS Lett* 587:206–213. doi: 10.1016/j.febslet.2012.11.027
- Miller SH, Browne P, Prigent-Combaret C, et al (2010) Biochemical and genomic comparison of inorganic phosphate solubilization in *Pseudomonas* species. *Environ Microbiol Rep* 2:403–411. doi: 10.1111/j.1758-2229.2009.00105.x
- Mora C, Tittensor DP, Adl S, et al (2011) How Many Species Are There on Earth and in the Ocean? *PLoS Biol* 9:e1001127. doi: 10.1371/journal.pbio.1001127
- Morris RO (1987) Genes Specifying Auxin and Cytokinin Biosynthesis in Prokaryotes. In: Davies PJ (ed) *Plant Hormones and their Role in Plant Growth and Development*. Springer Netherlands, pp 636–655
- Mueller KE, Eissenstat DM, Hobbie SE, et al (2012) Tree species effects on coupled cycles of carbon, nitrogen, and acidity in mineral soils at a common garden experiment. *Biogeochemistry* 111:601–614. doi: 10.1007/s10533-011-9695-7
- Müller G, Raymond KN (1984) Specificity and mechanism of ferrioxamine-mediated iron transport in *Streptomyces pilosus*. *J Bacteriol* 160:304–312.
- Murphy T, Roy I, Harrop A, et al (2008) Elicitation effects of oligosaccharides on the transcriptional level of bacitracin ABC transporter genes in *Bacillus licheniformis*. *Biotechnol Lett* 30:1665–1670. doi: 10.1007/s10529-008-9743-0

- Muthuselvan I, Balagurunathan R (2013) SIDEROPHORE PRODUCTION FROM AZOTOBACTER SP. AND ITS APPLICATION AS BIOCONTROL AGENT. *Int J Curr Res Rev* 5:23–35.
- Naz I, Bano A, Ul-Hassan T (2009) Isolation of phytohormones producing plant growth promoting rhizobacteria from weeds growing in Khewra salt range, Pakistan and their implication in providing salt tolerance to *Glycine max* L.
- Nazari B, Kobayashi M, Saito A, et al (2013) Chitin-Induced Gene Expression in Secondary Metabolic Pathways of *Streptomyces coelicolor* A3(2) Grown in Soil. *Appl Environ Microbiol* 79:707–713. doi: 10.1128/AEM.02217-12
- Nealson KH, Hastings JW (1979) Bacterial bioluminescence: its control and ecological significance. *Microbiol Rev* 43:496–518.
- Nett M, Ikeda H, Moore BS (2009) Genomic basis for natural product biosynthetic diversity in the actinomycetes. *Nat Prod Rep* 26:1362–1384. doi: 10.1039/B817069J
- Niemi K, Häggman H (2002) *Pisolithus tinctorius* promotes germination and forms mycorrhizal structures in Scots pine somatic embryos in vitro. *Mycorrhiza* 12:263–267. doi: 10.1007/s00572-002-0181-x
- Nishijyo T, Haas D, Itoh Y (2001) The CbrA–CbrB two-component regulatory system controls the utilization of multiple carbon and nitrogen sources in *Pseudomonas aeruginosa*. *Mol Microbiol* 40:917–931. doi: 10.1046/j.1365-2958.2001.02435.x
- Novotna J, Vohradsky J, Berndt P, et al (2003) Proteomic studies of diauxic lag in the differentiating prokaryote *Streptomyces coelicolor* reveal a regulatory network of stress-induced proteins and central metabolic enzymes. *Mol Microbiol* 48:1289–1303. doi: 10.1046/j.1365-2958.2003.03529.x
- Nützmann H-W, Reyes-Dominguez Y, Scherlach K, et al (2011) Bacteria-induced natural product formation in the fungus *Aspergillus nidulans* requires Saga/Ada-mediated histone acetylation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108:14282–14287. doi: 10.1073/pnas.1103523108
- O’Brien J, Wright GD (2011) An ecological perspective of microbial secondary metabolism. *Curr Opin Biotechnol* 22:552–8. doi: 10.1016/j.copbio.2011.03.010
- O’May GA, Reynolds N, Macfarlane GT (2005) Effect of pH on an In Vitro Model of Gastric Microbiota in Enteral Nutrition Patients. *Appl Environ Microbiol* 71:4777–4783. doi: 10.1128/AEM.71.8.4777-4783.2005
- O’Rourke S, Wietzorrek A, Fowler K, et al (2009) Extracellular signalling, translational control, two repressors and an activator all contribute to the regulation of methylenomycin production in *Streptomyces coelicolor*. *Mol Microbiol* 71:763–778. doi: 10.1111/j.1365-2958.2008.06560.x
- Ohnishi Y, Yamazaki H, Kato J, et al (2005) AdpA, a Central Transcriptional Regulator in the A-Factor Regulatory Cascade That Leads to Morphological Development and Secondary Metabolism in *Streptomyces griseus*. *Biosci Biotechnol Biochem* 69:431–439.
- Okamoto S, Taguchi T, Ochi K, Ichinose K (2009) Biosynthesis of Actinorhodin and Related Antibiotics: Discovery of Alternative Routes for Quinone Formation Encoded in the act Gene Cluster. *Chem Biol* 16:226–236. doi: 10.1016/j.chembiol.2009.01.015

- Onaka H, Mori Y, Igarashi Y, Furumai T (2010) Mycolic Acid-Containing Bacteria Induce Natural-Product Biosynthesis in *Streptomyces* Species. *Appl Environ Microbiol* 77:400–406. doi: 10.1128/AEM.01337-10
- Orozco-Mosqueda M del C, Macías-Rodríguez LI, Santoyo G, et al (2013) *Medicago truncatula* increases its iron-uptake mechanisms in response to volatile organic compounds produced by *Sinorhizobium meliloti*. *Folia Microbiol (Praha)* 58:579–585. doi: 10.1007/s12223-013-0243-9
- Paget MSB, Chamberlin L, Atrih A, et al (1999) Evidence that the Extracytoplasmic Function Sigma Factor ζE Is Required for Normal Cell Wall Structure in *Streptomyces coelicolor* A3(2). *J Bacteriol* 181:204–211.
- Pang X, Aigle B, Girardet J-M, et al (2004) Functional Angucycline-Like Antibiotic Gene Cluster in the Terminal Inverted Repeats of the *Streptomyces ambofaciens* Linear Chromosome. *Antimicrob Agents Chemother* 48:575–588. doi: 10.1128/AAC.48.2.575-588.2004
- Parker GG, Brown MJ (2000) Forest Canopy Stratification—Is It Useful? *Am Nat* 155:473–484. doi: 10.1086/303340
- Partida-Martinez LP, Hertweck C (2005) Pathogenic fungus harbours endosymbiotic bacteria for toxin production. *Nature* 437:884–888. doi: 10.1038/nature03997
- Partida-Martinez LP, Monajembashi S, Greulich K-O, Hertweck C (2007) Endosymbiont-Dependent Host Reproduction Maintains Bacterial-Fungal Mutualism. *Curr Biol* 17:773–777. doi: 10.1016/j.cub.2007.03.039
- Patel P, Song L, Challis GL (2010) Distinct extracytoplasmic siderophore binding proteins recognize ferrioxamines and ferricoelichelin in *Streptomyces coelicolor* A3(2). *Biochemistry (Mosc)* 49:8033–8042. doi: 10.1021/bi100451k
- Patten CL, Glick BR (1996) Bacterial biosynthesis of indole-3-acetic acid. *Can J Microbiol* 42:207–220. doi: 10.1139/m96-032
- Patterson GML, Bolis CM (1997) Fungal Cellwall Polysaccharides Elicit an Antifungal Secondary Metabolite (phytoalexin) in the Cyanobacterium *Scytonema Ocelutum*2. *J Phycol* 33:54–60. doi: 10.1111/j.0022-3646.1997.00054.x
- Peix A, Ramírez-Bahena M-H, Velázquez E (2009) Historical evolution and current status of the taxonomy of genus *Pseudomonas*. *Infect Genet Evol* 9:1132–1147. doi: 10.1016/j.meegid.2009.08.001
- Peñalva MA, Arst HN (2002) Regulation of Gene Expression by Ambient pH in Filamentous Fungi and Yeasts. *Microbiol Mol Biol Rev* 66:426–446. doi: 10.1128/MMBR.66.3.426-446.2002
- Perez J, Muñoz-Dorado J, Brana AF, et al (2011) *Myxococcus xanthus* induces actinorhodin overproduction and aerial mycelium formation by *Streptomyces coelicolor*. *Microb Biotechnol* 4:175–83. doi: 10.1111/j.1751-7915.2010.00208.x
- Pérez J, Muñoz-Dorado J, Braña AF, et al (2011) *Myxococcus xanthus* induces actinorhodin overproduction and aerial mycelium formation by *Streptomyces coelicolor*. *Microb Biotechnol* 4:175–183. doi: 10.1111/j.1751-7915.2010.00208.x
- Perrig D, Boiero ML, Masciarelli OA, et al (2007) Plant-growth-promoting compounds produced by two agronomically important strains of *Azospirillum brasilense*, and implications for

- inoculant formulation. *Appl Microbiol Biotechnol* 75:1143–1150. doi: 10.1007/s00253-007-0909-9
- Perron K, Comte R, Van Delden C (2005) DksA represses ribosomal gene transcription in *Pseudomonas aeruginosa* by interacting with RNA polymerase on ribosomal promoters. *Mol Microbiol* 56:1087–1102. doi: 10.1111/j.1365-2958.2005.04597.x
- Peterson SB, Dunn AK, Klimowicz AK, Handelsman J (2006) Peptidoglycan from *Bacillus cereus* Mediates Commensalism with Rhizosphere Bacteria from the Cytophaga-Flavobacterium Group. *Appl Environ Microbiol* 72:5421–5427. doi: 10.1128/AEM.02928-05
- Pierrel F, Douki T, Fontecave M, Atta M (2004) MiaB Protein Is a Bifunctional Radical-S-Adenosylmethionine Enzyme Involved in Thiolation and Methylation of tRNA. *J Biol Chem* 279:47555–47563. doi: 10.1074/jbc.M408562200
- Pierrel F, Hernandez HL, Johnson MK, et al (2003) MiaB Protein from *Thermotoga maritima* CHARACTERIZATION OF AN EXTREMELY THERMOPHILIC tRNA-METHYLTRANSFERASE. *J Biol Chem* 278:29515–29524. doi: 10.1074/jbc.M301518200
- Pinnert-Sindico S (1954) Une nouvelle espece de *Streptomyces* productrice d'antibiotiques: *Streptomyces ambofaciens* n sp caracteres culturaux.
- Pirhonen M, Flego D, Heikinheimo R, Palva ET (1993) A small diffusible signal molecule is responsible for the global control of virulence and exoenzyme production in the plant pathogen *Erwinia carotovora*. *EMBO J* 12:2467–2476.
- Ponraj P, Shankar M, Ilakkiam D, et al (2013) Influence of periplasmic oxidation of glucose on pyoverdine synthesis in *Pseudomonas putida* S11. *Appl Microbiol Biotechnol* 97:5027–5041. doi: 10.1007/s00253-013-4737-9
- Poole EJ, Bending GD, Whipps JM, Read DJ (2001) Bacteria associated with *Pinus sylvestris*–*Lactarius rufus* ectomycorrhizas and their effects on mycorrhiza formation in vitro. *New Phytol* 151:743–751. doi: 10.1046/j.0028-646x.2001.00219.x
- Pospiech A, Neumann B (1995) A Versatile Quick-Prep of Genomic Dna from Gram-Positive Bacteria. *Trends Genet* 11:217–218. doi: 10.1016/S0168-9525(00)89052-6
- Pujic P, Normand P (2009) La symbiose racinaire entre la bactérie *Frankia* et les plantes actinorhiziennes. *Biofutur* 26–29.
- Rahme LG, Stevens EJ, Wolfort SF, et al (1995) Common virulence factors for bacterial pathogenicity in plants and animals. *Science* 268:1899–1902. doi: 10.1126/science.7604262
- Ramette A, Frapolli M, Fischer-Le Saux M, et al (2011) *Pseudomonas protegens* sp. nov., widespread plant-protecting bacteria producing the biocontrol compounds 2,4-diacetylphloroglucinol and pyoluteorin. *Syst Appl Microbiol* 34:180–188. doi: 10.1016/j.syapm.2010.10.005
- Ramos JL, Martínez-Bueno M, Molina-Henares AJ, et al (2005) The TetR Family of Transcriptional Repressors. *Microbiol Mol Biol Rev* 69:326–356. doi: 10.1128/MMBR.69.2.326-356.2005
- Rana A, Saharan B, Nain L, et al (2012) Enhancing micronutrient uptake and yield of wheat through bacterial PGPR consortia. *Soil Sci Plant Nutr* 58:573–582. doi: 10.1080/00380768.2012.716750

- Ravel J, Cornelis P (2003) Genomics of pyoverdine-mediated iron uptake in pseudomonads. *Trends Microbiol* 11:195–200. doi: 10.1016/S0966-842X(03)00076-3
- Ravnskov S, Larsen J, Olsson PA, Jakobsen I (1999) Effects of various organic compounds on growth and phosphorus uptake of an arbuscular mycorrhizal fungus. *New Phytol* 141:517–524. doi: 10.1046/j.1469-8137.1999.00353.x
- Raymond KN, Dertz EA, Kim SS (2003) Enterobactin: An archetype for microbial iron transport. *Proc Natl Acad Sci* 100:3584–3588. doi: 10.1073/pnas.0630018100
- Reyes-Dominguez Y, Narendja F, Berger H, et al (2008) Nucleosome Positioning and Histone H3 Acetylation Are Independent Processes in the *Aspergillus nidulans* prnD-prnB Bidirectional Promoter. *Eukaryot Cell* 7:656–663. doi: 10.1128/EC.00184-07
- Riedlinger J, Schrey SD, Tarkka MT, et al (2006) Auxofuran, a Novel Metabolite That Stimulates the Growth of Fly Agaric, Is Produced by the Mycorrhiza Helper Bacterium *Streptomyces* Strain AcH 505. *Appl Environ Microbiol* 72:3550–3557. doi: 10.1128/AEM.72.5.3550-3557.2006
- Rigali S, Titgemeyer F, Barends S, et al (2008) Feast or famine: the global regulator DasR links nutrient stress to antibiotic production by *Streptomyces*. *Embo Rep* 9:670–675. doi: 10.1038/embor.2008.83
- Robert D, Catesson A-M (2000) *Organisation végétative*. Wolters Kluwer France
- Rodriguez F, Pfender WF (1997) Antibiosis and Antagonism of *Sclerotinia homoeocarpa* and *Drechslera poae* by *Pseudomonas fluorescens* Pf-5 In Vitro and In Planta. *Phytopathology* 87:614–621. doi: 10.1094/PHYTO.1997.87.6.614
- Rodriguez H, Fraga R (1999) Phosphate solubilizing bacteria and their role in plant growth promotion. *Biotechnol Adv* 17:319–39.
- Romero D, Traxler MF, López D, Kolter R (2011) Antibiotics as Signal Molecules. *Chem Rev* 111:5492–5505. doi: 10.1021/cr2000509
- Römmling U (2012) Cyclic di-GMP, an established secondary messenger still speeding up. *Environ Microbiol* 14:1817–1829. doi: 10.1111/j.1462-2920.2011.02617.x
- Ruby EG (1996) LESSONS FROM A COOPERATIVE, BACTERIAL-ANIMAL ASSOCIATION: The *Vibrio fischeri*–*Euprymna scolopes* Light Organ Symbiosis. *Annu Rev Microbiol* 50:591–624. doi: 10.1146/annurev.micro.50.1.591
- Rui L, Reardon KF, Wood TK (2005) Protein engineering of toluene ortho-monooxygenase of *Burkholderia cepacia* G4 for regiospecific hydroxylation of indole to form various indigoid compounds. *Appl Microbiol Biotechnol* 66:422–429. doi: 10.1007/s00253-004-1698-z
- Ryan RP, Dow JM (2008) Diffusible signals and interspecies communication in bacteria. *Microbiol-Sgm* 154:1845–1858. doi: 10.1099/mic.0.2008/017871-0
- Saito A, Fujii T, Miyashita K (2003) Distribution and evolution of chitinase genes in *Streptomyces* species: involvement of gene-duplication and domain-deletion. *Antonie Van Leeuwenhoek* 84:7–15. doi: 10.1023/A:1024463113606
- Samac DA, Kinkel LL (2001) Suppression of the root-lesion nematode (*Pratylenchus penetrans*) in alfalfa (*Medicago sativa*) by *Streptomyces* spp. *Plant Soil* 235:35–44. doi: 10.1023/A:1011820002779

- Samac DA, Willert AM, McBride MJ, Kinkel LL (2003) Effect of antibiotic-producing *Streptomyces* on nodulation and leaf spot in alfalfa. *Appl Soil Ecol* 22:55–66. doi: 10.1016/S0929-1393(02)00109-9
- Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T (1989) *Molecular cloning*, J.Biol.chem.
- Sangworachath N (2006) Investigation of the effects of oligosaccharides in liquid cultures of different actinomycetes. Ph.D., University of Westminster
- Sano Y, Matsui H, Kobayashi M, Kageyama M (1993) Molecular structures and functions of pyocins S1 and S2 in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol* 175:2907–2916.
- Sarniguet A, Kraus J, Henkels MD, et al (1995) The sigma factor sigma(S) affects antibiotic production and biological control activity of *Pseudomonas fluorescens* Pf-5. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92:12255–12259. doi: 10.1073/pnas.92.26.12255
- Schäberle TF, Orland A, König GM (2014) Enhanced production of undecylprodigiosin in *Streptomyces coelicolor* by co-cultivation with the coralolopyronin A-producing myxobacterium, *Coralloccoccus coralloides*. *Biotechnol Lett* 36:641–648. doi: 10.1007/s10529-013-1406-0
- Schalk IJ (2008) Metal trafficking via siderophores in Gram-negative bacteria: Specificities and characteristics of the pyoverdine pathway. *J Inorg Biochem* 102:1159–1169. doi: 10.1016/j.jinorgbio.2007.11.017
- Schalk IJ, Hannauer M, Braud A (2011) New roles for bacterial siderophores in metal transport and tolerance. *Environ Microbiol* 13:2844–2854. doi: 10.1111/j.1462-2920.2011.02556.x
- Schauder S, Bassler BL (2001) The languages of bacteria. *Genes Dev* 15:1468–1480. doi: 10.1101/gad.899601
- Schlatter D, Fubuh A, Xiao K, et al (2009) Resource Amendments Influence Density and Competitive Phenotypes of *Streptomyces* in Soil. *Microb Ecol* 57:413–420. doi: 10.1007/s00248-008-9433-4
- Schneider J, Yepes A, Garcia-Betancur JC, et al (2012) Streptomycin-Induced Expression in *Bacillus subtilis* of YtnP, a Lactonase-Homologous Protein That Inhibits Development and Streptomycin Production in *Streptomyces griseus*. *Appl Environ Microbiol* 78:599–603. doi: 10.1128/AEM.06992-11
- Schrey SD, Erkenbrack E, Frueh E, et al (2012) Production of fungal and bacterial growth modulating secondary metabolites is widespread among mycorrhiza-associated streptomycetes. *Bmc Microbiol* 12:164. doi: 10.1186/1471-2180-12-164
- Schrey SD, Schellhammer M, Ecke M, et al (2005) Mycorrhiza helper bacterium *Streptomyces* AcH 505 induces differential gene expression in the ectomycorrhizal fungus *Amanita muscaria*. *New Phytol* 168:205–216. doi: 10.1111/j.1469-8137.2005.01518.x
- Schrey SD, Tarkka MT (2008) Friends and foes: streptomycetes as modulators of plant disease and symbiosis. *Antonie Van Leeuwenhoek* 94:11–19. doi: 10.1007/s10482-008-9241-3
- Schroeckh V, Scherlach K, Nützmänn H-W, et al (2009) Intimate bacterial–fungal interaction triggers biosynthesis of archetypal polyketides in *Aspergillus nidulans*. *Proc Natl Acad Sci* 106:14558–14563. doi: 10.1073/pnas.0901870106

- Schubert S, Fischer D, Heesemann J (1999) Ferric enterochelin transport in *Yersinia enterocolitica*: molecular and evolutionary aspects. *J Bacteriol* 181:6387–6395.
- Schulz S, Dickschat JS, Kunze B, et al (2010) Biological Activity of Volatiles from Marine and Terrestrial Bacteria. *Mar Drugs* 8:2976–2987. doi: 10.3390/md8122976
- Sharifi-Tehrani A, Zala M, Natsch A, et al (1998) Biocontrol of soil-borne fungal plant diseases by 2,4-diacetylphloroglucinol-producing fluorescent pseudomonads with different restriction profiles of amplified 16S rDNA. *Eur J Plant Pathol* 104:631–643. doi: 10.1023/A:1008672104562
- Spaink HP (2000) Root Nodulation and Infection Factors Produced by Rhizobial Bacteria. *Annu Rev Microbiol* 54:257–288. doi: 10.1146/annurev.micro.54.1.257
- Srifuengfung S, Assanasen S, Tuntawiroon M, Meejanpetch S (2010) Comparison between *Pseudomonas aeruginosa* siderophores and desferrioxamine for iron acquisition from ferritin. *Asian Biomed* 4:631–635.
- Stanier RY, Palleroni NJ, Doudoroff M (1966) The Aerobic Pseudomonads a Taxonomic Study. *J Gen Microbiol* 43:159–271. doi: 10.1099/00221287-43-2-159
- Stockwell VO, Loper JE (2005) The sigma factor RpoS is required for stress tolerance and environmental fitness of *Pseudomonas fluorescens* Pf-5. *Microbiology* 151:3001–3009. doi: 10.1099/mic.0.28077-0
- Sun J, Kelemen GH, Fernández-Abalos JM, Bibb MJ (1999) Green fluorescent protein as a reporter for spatial and temporal gene expression in *Streptomyces coelicolor* A3(2). *Microbiology* 145:2221–2227.
- Suutari M, Lignell U, Hyvärinen A, Nevalainen A (2002) Media for cultivation of indoor streptomycetes. *J Microbiol Methods* 51:411–416. doi: 10.1016/S0167-7012(02)00100-8
- Suzuki S, Nakanishi E, Furihata K, et al (2008) Chitinase inhibitor allosamidin promotes chitinase production of *Streptomyces* generally. *Int J Biol Macromol* 43:13–19. doi: 10.1016/j.ijbiomac.2007.09.010
- Takahashi H, Kumagai T, Kitani K, et al (2007) Cloning and Characterization of a *Streptomyces* Single Module Type Non-ribosomal Peptide Synthetase Catalyzing a Blue Pigment Synthesis. *J Biol Chem* 282:9073–9081. doi: 10.1074/jbc.M611319200
- Takano E, Chakraborty R, Nihira T, et al (2001) A complex role for the γ -butyrolactone SCB1 in regulating antibiotic production in *Streptomyces coelicolor* A3(2). *Mol Microbiol* 41:1015–1028. doi: 10.1046/j.1365-2958.2001.02562.x
- Takano E, Gramajo HC, Strauch E, et al (1992) Transcriptional regulation of the redD transcriptional activator gene accounts for growth-phase-dependent production of the antibiotic undecylprodigiosin in *Streptomyces coelicolor* A3(2). *Mol Microbiol* 6:2797–2804. doi: 10.1111/j.1365-2958.1992.tb01459.x
- Takasuka TE, Book AJ, Lewin GR, et al (2013) Aerobic deconstruction of cellulosic biomass by an insect-associated *Streptomyces*. *Sci Rep* 3:1030. doi: 10.1038/srep01030
- Tanabe T, Funahashi T, Miyamoto K, et al (2011) Identification of Genes, desR and desA, Required for Utilization of Desferrioxamine B as a Xenosiderophore in *Vibrio furnissii*. *Biol Pharm Bull* 34:570–574.

- Tarkka MT, Lehr NA, Hampp R, Schrey SD (2008) Plant behavior upon contact with streptomycetes. *Plant Signal Behav* 3:917–919.
- Tashiro Y, Toyofuku M, Nakajima-Kambe T, et al (2010) Bicyclic compounds repress membrane vesicle production and *Pseudomonas* quinolone signal synthesis in *Pseudomonas aeruginosa*. *FEMS Microbiol Lett* 304:123–130. doi: 10.1111/j.1574-6968.2010.01897.x
- Tashiro Y, Yawata Y, Toyofuku M, et al (2013) Interspecies Interaction between *Pseudomonas aeruginosa* and Other Microorganisms. *Microbes Environ* 28:13–24. doi: 10.1264/jsme2.ME12167
- Theunis M, Kobayashi H, Broughton WJ, Prinsen E (2004) Flavonoids, NodD1, NodD2, and *Nod*-Box NB15 Modulate Expression of the *y4wEFG* Locus That Is Required for Indole-3-Acetic Acid Synthesis in *Rhizobium* sp. strain NGR234. *Mol Plant Microbe Interact* 17:1153–1161. doi: 10.1094/MPMI.2004.17.10.1153
- Thuler D s., Floh E i. s., Handro W, Barbosa H r. (2003) *Beijerinckia dextrii* releases plant growth regulators and amino acids in synthetic media independent of nitrogenase activity. *J Appl Microbiol* 95:799–806. doi: 10.1046/j.1365-2672.2003.02047.x
- Tomaras AP, Crandon JL, McPherson CJ, et al (2013) Adaptation-Based Resistance to Siderophore-Conjugated Antibacterial Agents by *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother* 57:4197–4207. doi: 10.1128/AAC.00629-13
- Tortora GJ, Funke, Case, Martin (2012) *Introduction à la microbiologie*. Éditions du Renouveau pédagogique, Saint-Laurent
- Traxler MF, Seyedsayamdost MR, Clardy J, Kolter R (2012) Interspecies modulation of bacterial development through iron competition and siderophore piracy: Xenosiderophores alter development in actinomycetes. *Mol Microbiol* 86:628–644. doi: 10.1111/mmi.12008
- Traxler MF, Watrous JD, Alexandrov T, et al (2013) Interspecies Interactions Stimulate Diversification of the *Streptomyces coelicolor* Secreted Metabolome. *mBio* 4:e00459–13–e00459–13. doi: 10.1128/mBio.00459-13
- Ueda K, Kawai S, Ogawa H, et al (2000) Wide distribution of interspecific stimulatory events on antibiotic production and sporulation among *Streptomyces* species. *J Antibiot (Tokyo)* 53:979–982.
- Uroz S, Buée M, Murat C, et al (2010) Pyrosequencing reveals a contrasted bacterial diversity between oak rhizosphere and surrounding soil. *Environ Microbiol Rep* 2:281–288. doi: 10.1111/j.1758-2229.2009.00117.x
- Uroz S, Calvaruso C, Turpault MP, et al (2007) Effect of the Mycorrhizosphere on the Genotypic and Metabolic Diversity of the Bacterial Communities Involved in Mineral Weathering in a Forest Soil. *Appl Environ Microbiol* 73:3019–3027. doi: 10.1128/AEM.00121-07
- Uroz S, Calvaruso C, Turpault MP, et al (2009) Efficient mineral weathering is a distinctive functional trait of the bacterial genus *Collimonas*. *Soil Biol Biochem* 41:2178–2186. doi: 10.1016/j.soilbio.2009.07.031
- Uroz S, Courty PE, Pierrat JC, et al (2013) Functional Profiling and Distribution of the Forest Soil Bacterial Communities Along the Soil Mycorrhizosphere Continuum. *Microb Ecol* 66:404–415. doi: 10.1007/s00248-013-0199-y

- Uroz S, Oger P, Lepleux C, et al (2011) Bacterial weathering and its contribution to nutrient cycling in temperate forest ecosystems. *Res Microbiol* 162:820–831. doi: 10.1016/j.resmic.2011.01.013
- Uroz S, Oger PM, Chapelle E, et al (2008) A *Rhodococcus* qsdA-Encoded Enzyme Defines a Novel Class of Large-Spectrum Quorum-Quenching Lactonases. *Appl Environ Microbiol* 74:1357–1366. doi: 10.1128/AEM.02014-07
- Vargas-Bautista C, Rahlwes K, Straight P (2013) Bacterial Competition Reveals Differential Regulation of the pks Genes by *Bacillus subtilis*. *J Bacteriol* JB.01022–13. doi: 10.1128/JB.01022-13
- Veggi D, Gentile MA, Cantini F, et al (2012) The Factor H Binding Protein of *Neisseria meningitidis* Interacts with Xenosiderophores in Vitro. *Biochemistry (Mosc)* 51:9384–9393. doi: 10.1021/bi301161w
- Vetsigian K, Jajoo R, Kishony R (2011) Structure and Evolution of *Streptomyces* Interaction Networks in Soil and In Silico. *PLoS Biol* 9:e1001184. doi: 10.1371/journal.pbio.1001184
- Visca P, Imperi F, Lamont IL (2007) Pyoverdine siderophores: from biogenesis to biosignificance. *Trends Microbiol* 15:22–30. doi: 10.1016/j.tim.2006.11.004
- Visca P, Leoni L, Wilson MJ, Lamont IL (2002) Iron transport and regulation, cell signalling and genomics: lessons from *Escherichia coli* and *Pseudomonas*. *Mol Microbiol* 45:1177–1190.
- Visick KL, Fuqua C (2005) Decoding Microbial Chatter: Cell-Cell Communication in Bacteria. *J Bacteriol* 187:5507–5519. doi: 10.1128/JB.187.16.5507-5519.2005
- Waters CM, Bassler BL (2005) QUORUM SENSING: Cell-to-Cell Communication in Bacteria. *Annu Rev Cell Dev Biol* 21:319–346. doi: 10.1146/annurev.cellbio.21.012704.131001
- Watrous J, Roach P, Alexandrov T, et al (2012) Mass spectral molecular networking of living microbial colonies. *Proc Natl Acad Sci* 201203689. doi: 10.1073/pnas.1203689109
- Watve MG, Tickoo R, Jog MM, Bhole BD (2001) How many antibiotics are produced by the genus *Streptomyces*? *Arch Microbiol* 176:386–390. doi: 10.1007/s002030100345
- Welch SA, Taunton AE, Banfield JF (2002) Effect of Microorganisms and Microbial Metabolites on Apatite Dissolution. *Geomicrobiol J* 19:343–367. doi: 10.1080/01490450290098414
- Werra P de, Péchy-Tarr M, Keel C, Maurhofer M (2009) Role of Gluconic Acid Production in the Regulation of Biocontrol Traits of *Pseudomonas fluorescens* CHA0. *Appl Environ Microbiol* 75:4162–4174. doi: 10.1128/AEM.00295-09
- Whistler CA, Corbell NA, Sarniguet A, et al (1998) The two-component regulators GacS and GacA influence accumulation of the stationary-phase sigma factor sigma(S) and the stress response in *Pseudomonas fluorescens* Pf-5. *J Bacteriol* 180:6635–6641.
- Whistler CA, Stockwell VO, Loper JE (2000) Lon Protease Influences Antibiotic Production and UV Tolerance of *Pseudomonas fluorescens* Pf-5. *Appl Environ Microbiol* 66:2718–2725. doi: 10.1128/AEM.66.7.2718-2725.2000
- Wietz M, Duncan K, Patin NV, Jensen PR (2013) Antagonistic Interactions Mediated by Marine Bacteria: The Role of Small Molecules. *J Chem Ecol* 39:879–891. doi: 10.1007/s10886-013-0316-x

- Williams P (2007) Quorum sensing, communication and cross-kingdom signalling in the bacterial world. *Microbiol Read Engl* 153:3923–3938. doi: 10.1099/mic.0.2007/012856-0
- Willig S, Varanini Z, Nannipieri P (2000) *The Rhizosphere: Biochemistry and Organic Substance at the Soil-Plant Interface: Biochemistry and Organic Substance at the Soil-Plant Interface*. CRC Press
- Winson MK, Camara M, Latifi A, et al (1995) Multiple N-acyl-L-homoserine lactone signal molecules regulate production of virulence determinants and secondary metabolites in *Pseudomonas aeruginosa*. *Proc Natl Acad Sci* 92:9427–9431.
- Wright LF, Hopwood DA (1976) Actinorhodin is a Chromosomally-determined Antibiotic in *Streptomyces coelicolor* A3(2). *J Gen Microbiol* 96:289–297. doi: 10.1099/00221287-96-2-289
- Xie ZP, Staehelin C, Vierheilig H, et al (1995) Rhizobial Nodulation Factors Stimulate Mycorrhizal Colonization of Nodulating and Nonnodulating Soybeans. *Plant Physiol* 108:1519–1525. doi: 10.1104/pp.108.4.1519
- Yamanaka K (2005a) Desferrioxamine E produced by *Streptomyces griseus* stimulates growth and development of *Streptomyces tanashiensis*. *Microbiology* 151:2899–2905. doi: 10.1099/mic.0.28139-0
- Yamanaka K (2005b) Desferrioxamine E produced by *Streptomyces griseus* stimulates growth and development of *Streptomyces tanashiensis*. *Microbiology* 151:2899–2905. doi: 10.1099/mic.0.28139-0
- Yang Y-L, Xu Y, Straight P, Dorrestein PC (2009) Translating metabolic exchange with imaging mass spectrometry. *Nat Chem Biol* 5:885–887. doi: 10.1038/nchembio.252
- Yeoh HT, Bungay HR, Krieg NR (1968) A microbial interaction involving combined mutualism and inhibition. *Can J Microbiol* 14:491–492. doi: 10.1139/m68-083
- Yim G, Huimi Wang H, Davies J (2006) The truth about antibiotics. *Int J Med Microbiol* 296:163–170. doi: 10.1016/j.ijmm.2006.01.039
- Yim G, Wang HH, Frs JD (2007) Antibiotics as signalling molecules. *Philos Trans R Soc B Biol Sci* 362:1195–1200. doi: 10.1098/rstb.2007.2044
- Zawadzka AM, Vandecasteele FP., Crawford RL, Paszczynski AJ (2006) Identification of siderophores of *Pseudomonas stutzeri*. *Can J Microbiol* 52:1164–1176. doi: 10.1139/w06-077
- Zhang A, Jiang M, Zhang J, et al (2007) Nitric oxide induced by hydrogen peroxide mediates abscisic acid-induced activation of the mitogen-activated protein kinase cascade involved in antioxidant defense in maize leaves. *New Phytol* 175:36–50. doi: 10.1111/j.1469-8137.2007.02071.x
- Zhang L, Fritsch M, Hammond L, et al (2013) Identification of Genes Involved in *Pseudomonas aeruginosa* Biofilm-Specific Resistance to Antibiotics. *PLoS ONE* 8:e61625. doi: 10.1371/journal.pone.0061625
- Zientz E, Feldhaar H, Stoll S, Gross R (2005) Insights into the microbial world associated with ants. *Arch Microbiol* 184:199–206. doi: 10.1007/s00203-005-0041-0

Résumé

Les *Streptomyces* sont des bactéries communes des écosystèmes forestiers tempérés. Elles sont présentes au sein de différentes niches écologiques telles que la rhizosphère des plantes, la mycorrhizosphère ou encore la minéralosphère. Dans ces niches, elles interagissent avec de nombreux autres genres bactériens et différents champignons symbiotiques, pathogènes et saprophytes. Bien que les membres du genre *Streptomyces* soient bien connus pour leur capacité à produire une grande variété de métabolites secondaires, le rôle écologique de ces produits naturels reste largement inconnu. Si leur rôle en tant que molécules antagonistes est probable, ils pourraient également fournir des signaux chimiques dans la communication intercellulaire et jouer un rôle majeur dans la structuration des communautés microbiennes du sol. La question se pose alors de savoir si en retour, l'environnement biotique de *Streptomyces* module les voies de biosynthèse de métabolites secondaires chez ces bactéries et s'il impacte leur comportement au sein des communautés microbiennes du sol.

Afin de répondre à ces questions, nous avons entrepris une étude sur l'interaction entre deux souches bactériennes modèles du sol *Streptomyces ambofaciens* ATCC23877 et *Pseudomonas fluorescens* BBc6R8. *S. ambofaciens* ATCC23877 est connue pour produire au moins cinq molécules antimicrobiennes et deux sidérophores et l'analyse de son génome a révélé la présence de 16 clusters de gènes supplémentaires impliqués dans la synthèse de métabolites secondaires. *P. fluorescens* BBc6R8 est une bactérie auxiliaire de mycorrhization isolée de fructifications du champignon *Laccaria bicolor*. Des expériences de cocultures sur différents milieux gélosés ont révélé que chaque souche bactérienne affecte la production de métabolites secondaires chez l'autre partenaire. Ainsi, *P. fluorescens* inhibe la capacité de *S. ambofaciens* à produire la kinamycine, un « effet ping-pong » a été mis en évidence. D'autre part, sur un milieu déficient en fer, *P. fluorescens* est capable d'utiliser les desferrioxamines et la coelicheline produites par *S. ambofaciens* en tant que xénosidérophores et ne produit alors plus ses propres sidérophores, la pyoverdine et l'énantio-pyochéline. La protéine FoxA de *P. fluorescens* BBc6R8, un récepteur TonB-dépendant, est impliquée dans la détection et l'utilisation de ces deux sidérophores de *S. ambofaciens* ATCC 23877. Enfin, au cours des études d'interactions, *P. fluorescens* BBc6R8 s'est révélée capable d'inhiber la production du pigment bleu diffusible γ -actinorhodine chez *Streptomyces coelicolor* A3(2) M145 en acidifiant le milieu par la production d'acide gluconique. D'autres souches de *Pseudomonas* fluorescent et la souche opportuniste *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 empêche, de la même manière, la production de γ -actinorhodine. L'ensemble de ces résultats nous permet de proposer différentes hypothèses sur l'importance écologique de ces trois interactions en les replaçant au sein du contexte de l'écosystème sol.

Mots clés: *Streptomyces*, *Pseudomonas fluorescens*, interactions, dialogue moléculaire, métabolites secondaires, xénosidérophores, antibiotique, écosystème sol

Abstract

Streptomyces are common bacteria in temperate forest ecosystems, which inhabit various ecological niches such as plant rhizosphere and mycorrhizosphere, as well as mineralosphere. In these niches, they interact with many other bacterial genera and different symbiotic, pathogenic and saprotrophic fungi. Although the members of the *Streptomyces* genus are well known for their ability to produce a vast variety of secondary metabolites, the ecological role of these natural products remains largely unknown. If their role as biological weapons is likely, they could also provide chemical signals in intercellular communication and play a major role in structuring soil microbial communities. The question also arises how, in return, the biotic environment of *Streptomyces* modulates the biosynthetic pathways of secondary metabolites in these bacteria and impacts their behaviour in the soil microbial communities.

In order to respond to these challenging questions, we have initiated a study on interaction between two soil model bacteria strains *Streptomyces ambofaciens* ATCC23877 and *Pseudomonas fluorescens* BBc6R8. *S. ambofaciens* ATCC23877 is known to produce at least five antimicrobial molecules and two siderophores and the analysis of its genome has revealed 16 additional secondary metabolite gene clusters. *P. fluorescens* BBc6R8 is a mycorrhiza helper bacterium isolated from fruiting bodies of the fungus *Laccaria bicolor*. Cocultures experiments on different agar media have revealed that each bacteria affects the production of secondary metabolites in the other partner. Thus, *P. fluorescens* inhibits the ability of *S. ambofaciens* to produce kanamycin, a "ping-pong effect" was highlighted. On the other hand, on iron deficient medium, *P. fluorescens* is able to use the desferrioxamines and coelichelin produced by *S. ambofaciens* as xenosiderophores and does no longer produce its own siderophores, pyoverdine and enantio-pyochelin. The FoxA protein of *P. fluorescens* BBc6R8, a TonB-dependent receptor, is involved in the use and detection of these two siderophore *S. ambofaciens* ATCC 23877. In another way, during pairwise co-culture experiments, *Pseudomonas fluorescens* BBc6R8 was shown to prevent the production of the diffusible blue pigment antibiotic γ -actinorhodin by *Streptomyces coelicolor* A3(2) M145 by acidifying the medium through the production of gluconic acid. Other fluorescent *Pseudomonas* strains and the opportunistic pathogen *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 also prevented the γ -actinorhodin production in a similar way. Altogether these results prompt us to propose some hypotheses on the ecological significance of these three interactions by replacing them in the soil ecosystem context.

Key words : *Streptomyces*, *Pseudomonas fluorescens*, interactions, molecular dialogue, secondary metabolites, xenosiderophores, antibiotic, soil ecosystem