

Faculté des bioingénieurs

Interaction entre les communautés endophytes du xylème et les bactéries phytopathogènes :

Le cas de *Brenneria salicis* et *Xylella fastidiosa*
chez les Saules et Peupliers

Auteur : Félicien Timmermans
Promoteur : Prof. Claude Bragard
Lectrices: Prof. Anne Legrève, Dr. Céline Vaïanopoulos et Léna Pesenti
Année académique 2024-2025
Mémoire de fin d'études présenté en vue de l'obtention du diplôme de
Bioingénieur : sciences agronomiques

Remerciements

La réalisation de ce mémoire a été une expérience unique qui n'aurait pas pu prendre forme sans le soutien, les conseils et les interventions d'un bon nombre de personnes.

Je remercie tout d'abord mon promoteur, le Professeur Claude Bragard, pour sa confiance, son expertise, ses conseils et son temps. Je le remercie également de m'avoir accueilli, avec la Professeure Anne Legrève, au sein de leur laboratoire.

Je remercie également Léna Pesenti de m'avoir immergé dans son sujet de thèse de doctorat avec passion, patience, rigueur et confiance. Je lui suis reconnaissant pour son accompagnement au sein et en dehors du laboratoire, pour ses relectures attentives et ses remarques. Léna a su m'accompagner de manière soutenante tout au long du processus en se montrant disponible, à l'écoute et bienveillante. Sans elle, ce travail n'aurait pu prendre forme d'aucune manière.

Je remercie François Nikis pour son aide précieuse dans le séquençage. Je remercie également tout le reste de l'équipe du laboratoire de santé végétale (SAVE), qui s'est toujours montrée disponible pour m'aider de quelque manière que ce soit.

Je remercie l'ensemble de mes compagnons de route mémorants pour nos échanges fertiles, avec un remerciement spécial pour Steven, qui m'a notamment permis de mieux saisir certaines subtilités de la bioinformatique.

Je remercie également les membres de mon jury, la Professeure Anne Legrève et la Docteure Céline Vaïanopoulos, pour le temps qu'elles ont consacré à la lecture de mon mémoire.

Je tiens enfin à remercier ma famille et mes proches pour leur présence tout au long de cette aventure. Merci Papa pour ton soutien sans faille, tes conseils et tes relectures rigoureuses. Merci Maman pour ton soutien, ta force et ta confiance. Finalement, merci à Julie et à mes amis pour leur présence, écoute, idées et soutien indéfectible.

À toutes et à tous, merci !

Félicien

Table des matières

Introduction	1
1 État de l’art	3
1.1 Le cas de <i>Xylella fastidiosa</i> et <i>Brenneria salicis</i>	3
1.1.1 Taxonomie	4
1.1.2 Biologie de XF et BS	5
1.1.2.1 Transmission	7
1.1.2.2 Plantes hôtes	7
1.1.2.3 Symptômes	8
1.1.2.4 BS et XF comme endophytes	9
1.1.3 Importance économique, écologique et méthode de lutt	9
1.1.3.1 Distribution géographique	9
1.1.3.2 Impact économique	10
1.1.3.3 Méthodes de lutte	10
1.2 Les Salicacées	11
1.2.1 Répartition, origines et anatomie	12
1.2.2 <i>Salix</i> et <i>Populus</i>	13
1.2.2.1 Contexte historique en Europe	13
1.2.2.2 Contexte économique en Europe	14
1.2.2.3 Importance écologique	14
1.2.2.4 Organismes modèles	14
1.2.2.5 Hôtes potentiels pour XF et BS en Belgique	15
1.3 Généralités sur le xylème et les microorganismes associés	16
1.3.1 Structure et propriétés physicochimiques du xylème	16
1.3.2 Microbes et sève xylémienne	17
1.3.2.1 Bactéries phytopathogènes du xylème	17
1.3.2.2 Réponse du xylème face aux agents phytopathogènes	18
1.3.3 L’endophytome	18
1.3.3.1 Étude de l’endophytome	19

1.3.3.2	Interactions entre le Microbiote xylémien et BS et XF	20
2	Objectifs	23
3	Matériels et méthodes	25
3.1	Souches étudiées	25
3.1.1	<i>Brenneria salicis</i> et <i>Xylella fastidiosa</i>	25
3.1.2	Endophytes étudiés	25
3.1.2.1	Endophytes d'intérêt	26
3.1.3	Milieux de culture	26
3.1.3.1	Composition des milieux	26
3.2	Métagénomique	27
3.2.1	Extraction de sève xylémienne	27
3.2.2	Extraction d'ADN du matériel végétal	28
3.2.2.1	Extraction de l'ADN bactérien dans les feuilles	28
3.2.2.2	Extraction de sève	28
3.2.3	Amplification PCR des régions V1 jusqu'à V9 du gène ARNr 16S	29
3.2.3.1	Gel d'électrophorèse	30
3.3	Protocole de confrontation <i>in vivo</i> endophytes-pathogènes	30
3.3.1	Détermination du lien entre la densité optique (DO) et les "colony forming unit" (CFU)	32
3.3.2	Insertion du plasmide Tn7-mCherry chez les <i>Bacillus</i>	33
3.3.2.1	Vérification	33
3.3.3	Inoculation "Pinprick"	34
3.4	Étude milieu-dépendante du microbiote xylémien des <i>Salicaceae</i>	35
3.4.1	Récupération, amplification et purification de l'ADN bactérien	35
3.4.1.1	Récupération de l'ADN bactérien	35
3.4.1.2	Amplification	35
3.4.1.3	Purification	35
3.4.2	Traitement des données	36
3.4.2.1	Nettoyage, alignement des séquences et comparaison	36
3.4.2.2	Post-traitement des données	36
4	Résultats	37
4.0.1	Lien entre densité optique (DO) et CFU	37
4.1	Transformation des <i>Bacillus</i>	38
4.1.1	Vérification PCR	38
4.2	Confrontation <i>in vivo</i> endophytes-pathogènes	38
4.2.1	Résultat des inoculations	38

4.3	Amplification de sève	40
4.4	Étude milieu-dépendante du microbiote xylémien de <i>Salicaceae</i>	41
4.4.1	Amplification et caractérisation	41
4.4.2	Diversité taxonomique des microbiotes xylémiens	42
4.4.2.1	Diversité chez les <i>Salix</i> et <i>Populus</i>	42
4.4.2.2	Diversité taxonomique au sein des genres <i>Salix</i> et <i>Populus</i>	45
5	Discussion	47
5.1	Analyse des résultats expérimentaux	48
5.1.1	Transformation des <i>Bacillus</i>	48
5.1.2	Interactions <i>in planta</i> entre endophytes et pathogènes	49
5.1.3	Amplification de sève xylémienne	50
5.1.4	Caractérisation du microbiote xylémien de <i>Salix</i> et <i>Populus</i> . .	52
5.1.4.1	Microbiote et sensibilité à XF et BS	53
6	Conclusion	55
	Bibliographie	57
	Annexes	67
A	Cycle PCR avec la polymérase MM Phusion	68
B	Graphes DO-CFU	68
C	Tableau récapitulatif de l'ensemble des souches alignées avec BLAST sur la base de donnée NCBI	69
D	Extraction d'ADN T0	69
E	Amplification MM Phusion	70
F	Tableau d'identification des espèces bactériennes détectées plusieurs fois	71
G	Tableau récapitulatif de l'ensemble des souches alignées avec BLAST sur la base de donnée NCBI	72

Liste des acronymes :

- **ADN** - Acide désoxyribonucléique
- **ARN** - Acide ribonucléique
- **ARNr** - ARN ribosomique
- **BCYE** - Buffered Charcoal Yeast Extract
- **BLAST** - Basic Local Alignment Search Tool
- **BS** - *Brenneria salicis*
- **CFU** - Colony Forming Units
- **CTAB** - CetylTrimethylAmmonium Bromide
- **DO** - Densité optique
- **EDTA** - Acide éthylène diamine Tétra-Acétique
- **EFSA** - European Food Safety Authority
- **EPPO** - European and Mediterranean Plant Protection Organization
- **FAO** - Food and Agriculture Organization of the United Nations
- **GFP** - Green Fluorescent Protein
- **LBA** - Lysogeny Broth Agar
- **MLSA** - Multilocus Sequence Analysis
- **MLST** - Multilocus Sequence Typing
- **NCBI** - National Center for Biotechnology Information
- **PBS** - Phosphate-Buffered Saline
- **PDA** - Potato Dextrose Agar
- **PI** - Pourcentage d'identité par paires
- **PGP** - Plant Growth Promoting
- **PNA** - Peptide Nucleic Acid
- **PNAc** - PNA spécifiques pour séquences chloroplastiques
- **PNAm** - PNA spécifiques pour séquences mitochondriales
- **PVP** - Poly vinyl pyrrolidone
- **RA** - Régions amplifiées
- **SST3** - Système d'excrétion de type III
- **TE** - Tris-EDTA
- **TSA** - Tryptic Soy Agar
- **UV** - Ultraviolet
- **XF** - *Xylella fastidiosa*

Table des figures

1.1	Distribution géographique de XF.	10
4.1	Amplification d'ADN de sève avec polymérase MM Phusion, PNAc et PNA _m	41
4.2	Représentation graphique des espèces bactériennes détectées plusieurs fois avec BLAST par famille bactérienne.	42
4.3	Diagramme de Venn illustrant les espèces bactériennes communes isolées chez <i>Salix</i> et <i>Populus</i>	43
4.4	Répartition taxonomique en pourcentage des différentes familles bactériennes isolées chez les genres <i>Salix</i> et <i>Populus</i>	44
4.5	Répartition taxonomique en pourcentage des différents genres bactériens isolés chez les genres <i>Salix</i> et <i>Populus</i>	44
4.6	Diagramme de Venn illustrant les espèces bactériennes communes isolées chez <i>S. caprea</i> , <i>S. alba</i> et <i>S. fragilis</i>	45
4.7	Diagramme de Venn illustrant les espèces bactériennes communes isolées chez <i>P. canescens</i> , <i>P. nigra</i> et <i>P. tremula</i>	46
4.8	Répartition taxonomique en pourcentage des différentes familles bactériennes au sein des espèces <i>P. canescens</i> , <i>P. nigra</i> , <i>P. tremula</i> , <i>S. alba</i> , <i>S. caprea</i> et <i>S. fragilis</i>	46
1	Graphique représentant le lien entre la DO et les CFU sur le domaine de DO étudié.	68
2	Gel T0 vérifiant la présence de XF et BS dans les plants de tabac. . .	69
3	Gel PCR de l'amplification d'ADN de sève avec la polymérase MM Phusion	70

Liste des tableaux

1.1	Taxonomie de XF et BS (CABI, 2022b, CABI, 2022a)	5
1.2	Tableau comparatif entre XF et BS	6
3.1	Endophytes d'intérêt : espèces, souches correspondantes et espèce de l'arbre dont la souche a été isolée. où les souches surlignées en rouges expriment déjà le gène mCherry	26
3.2	Composition de 400 mL de milieu LBA (Bertani, 1951)	27
3.3	Composition de 400 mL de milieu TSA (Atlas, 2004)	27
3.4	Composition de 400 mL de milieu PDA	27
3.5	Composition de 400 mL de milieu BCYE (Wells et al., 1981)	27
3.6	Composition de 100 mL de CTAB (Lohdi et al., 1994).	28
3.7	Amorces d'amplification du gène de l'ARNr 16S (Center, 2019).	29
3.8	Composition pour 25 µL d'un mélange PCR.	29
3.9	Cycle PCR 16S.	30
3.10	Plan expérimental des inoculations sur <i>N. tabacum</i> var. Xanthi.	31
3.11	Amorces d'amplifications spécifiques à <i>Brenneria Salicis</i> et <i>Xylella fastidiosa</i> (Minsavage et al., 1994, Hauben et al., 1998).	31
3.12	Séquences des amorces sens communes à toutes les bactéries et anti-sens spécifiques à chaque bactérie.	32
3.13	Composition de 500 mL de tampon PBS (EPPO (2018)).	32
3.14	Amorces spécifiques au plasmide Tn7 mCherry.	34
3.15	Composition de 400 mL de tampon SCP (EPPO (2018)).	34
4.1	Coefficients a et b du modèle $y = ax + b$ pour le lien entre DO et CFU pour chaque souche étudiée.	37
4.2	Résultats des tests PCR effectués sur les plants de tabac inoculés avec différents pathogènes et endophytes.	39
1	Cycle PCR 16S.	68

2	Identification des espèces bactériennes détectées plusieurs fois avec BLAST, de leur famille bactérienne correspondante et leur occurrence.	71
3	Tableau récapitulatif de l'ensemble des souches alignées avec CLAST sur la base de donnée NCBI.	72

Introduction

Les écosystèmes végétaux sont des entités complexes où les interactions entre plantes, microbes et environnement jouent un rôle fondamental dans la santé et la productivité des plantes (Meshram et al., 2022). Parmi ces interactions, le xylème, tissu vasculaire essentiel au transport de l'eau et des nutriments, constitue une niche écologique unique, abritant une diversité microbienne qui influence fortement la santé des plantes (De La Fuente et al., 2022, Purcell et Hopkins, 1996). Cependant, cette niche peut également devenir le théâtre de l'activité de pathogènes destructeurs spécialistes du xylème, comme *Xylella fastidiosa* (XF) et *Brenneria salicis* (BS), responsables de maladies dévastatrices chez de nombreuses espèces végétales (De La Fuente et al., 2022).

XF, bactérie xylème-limitée, est à l'origine de maladies telles que la *Pierce disease of grapevine* ou le *Olive quick decline syndrome*. Endémique au continent américain, XF a été détectée en Europe pour la première fois en 2013 et représente une menace majeure pour les cultures agricoles et les écosystèmes naturels, avec des pertes économiques estimées à plusieurs milliards d'euros (EFSA, 2023). De son côté, BS, responsable de la *Watermark disease* sur les saules, pose également des problèmes dans les régions tempérées, affectant non seulement la biodiversité locale mais aussi les industries forestières (Pesenti, 2024).

Le rôle important du microbiote xylémien dans la santé des plantes face à ces pathogènes est indiscutable selon la communauté scientifique (Maes et al., 2009, Anguita-Maeso et al., 2020). En effet, BS et XF peuvent se comporter de manière pathogène ou dormante au sein d'une même plante hôte. Les interactions complexes, où le microbiote peut à la fois faciliter ou entraver la progression des pathogènes, restent encore mal comprises. Une compréhension approfondie de ces mécanismes pourrait ouvrir la voie à des stratégies innovantes de gestion biologique, en exploitant les communautés microbiennes pour limiter les impacts des pathogènes (Meshram et al., 2022).

En parallèle, les avancées en biotechnologie et en génomique, telles que les analyses métagénomiques et les approches basées sur l'ARNr 16S, permettent aujourd'hui de caractériser plus finement ces communautés microbiennes. Ces outils offrent un aperçu global des interactions entre microbiote et pathogènes, révélant les mécanismes biologiques sous-jacents et leurs implications pour la santé des plantes (Fadeev et al., 2021, Fatima et al., 2024).

Ce travail s'inscrit dans cette dynamique et vise à explorer les interactions entre les

communautés microbiennes xylémiennes et les pathogènes XF et BS, en mettant l'accent sur les espèces du genre *Salix* et *Populus*, essentielles aux écosystèmes européens. Par ce mémoire, nous espérons contribuer à une meilleure compréhension des interactions plantes-microbes-pathogènes et fournir des bases solides pour le développement de nouvelles méthodes de gestion durable des maladies des plantes.

Le premier objectif de ce travail est de tenter d'observer les interactions entre les pathogènes XF et BS avec des endophytes sélectionnés pour leurs propriétés PGP et antagonistes aux pathogènes *in vitro* isolés des genres *Salix* et *Populus*. Le second objectif est de caractériser le microbiote xylémien des saules et peupliers. Cela en s'essayant à l'analyse métagénomique et par une méthode culture-dépendante.

Ce travail commencera par le chapitre 1 comportant la description des pathogènes XF et BS, une présentation de la famille des *Salicaceae*, puis des généralités sur le xylème et ses microorganismes associés. Les objectifs détaillés de ce mémoire sont traités dans le chapitre 2. Les dispositifs expérimentaux sont décrits dans le chapitre 3. Enfin, les résultats obtenus seront présentés dans le chapitre 4 et discutés dans le chapitre 5.

Chapitre 1

État de l'art

1.1 Le cas de *Xylella fastidiosa* et *Brenneria salicis*

Les premiers signes de XF sont observés en 1887 par Newton B. Pierce, qui a décrit la *Pierce disease of grapevine* affectant les vignes en Californie. Pendant longtemps, l'agent causal a été associé à un virus, jusqu'à ce que la bactérie soit isolée en 1978 et nommée *Xylella fastidiosa*. "Fastidiosa" car l'espèce est fastidieuse à cultiver sur milieux *in vitro* (Purcell et al., 1981). Cette bactérie est responsable de nombreuses maladies graves, comme la *phony peach disease* sur pêchers aux États-Unis ou *Citrus variegated chlorosis* au Brésil, qui a fortement impacté l'industrie des agrumes. Elle cause également des dégâts sur les arbres ornementaux (CABI, 2022b ; Purcell et al., 1981).

En Europe, XF a été détectée pour la première fois en Italie en 2013, où elle a provoqué le *Olive quick decline syndrome*, causant des pertes économiques catastrophiques. Depuis, elle s'est rapidement propagée dans plusieurs pays européens, devenant l'une des principales menaces phytosanitaires pour l'agriculture en Europe (EFSA, 2023).

BS est une bactérie phytopathogène responsable de la *Watermark Disease*, signalée pour la première fois en 1921 en Angleterre (Dowson, 1937). Cette maladie, considérée comme l'une des plus graves affectant les saules (*Salix* spp.), se manifeste par une accumulation anormale d'humidité dans le bois, liée à des perturbations de la conductivité de l'eau (Hanneke et al., 2009). BS anciennement appelée *Erwinia salicis*, réside également de manière asymptomatique dans d'autres espèces d'arbres, comme les peupliers et les aulnes, mais seuls les saules développent des symptômes.

Le passage de BS de l'état endophyte à un état pathogène reste mal compris, tout comme l'interaction complexe entre la plante et la bactérie. Il est admis que BS peut pas causer la maladie seule, et qu'un ou plusieurs facteurs supplémentaires, encore inconnus, sont nécessaires pour déclencher la pathogénicité (Maes et al., 2009).

XF et BS sont deux bactéries phytopathogènes du xylème pour lesquelles aucun traitement curatif applicable en culture n'existe à ce jour. Elles partagent des hôtes communs et peuvent toutes deux adopter un comportement dormant au sein de leur hôte (CABI, 2022b, CABI, 2022a, Maes et al., 2009).

1.1.1 Taxonomie

Ces dernières années, les progrès en génomique ont considérablement affiné la classification des microorganismes. Initialement, cette évolution a été soutenue par l'utilisation du gène Acide ribonucléique ribosomique (ARNr) 16S ainsi que par des approches telles que l'analyse et le typage par séquences multilocus (MLSA et MLST). La MLSA permet de différencier les espèces au sein d'un genre et d'identifier des sous-espèces, tandis que la MLST est utilisée pour distinguer les sous-espèces entre elles. Plus récemment, ces approches ont été supplantées par des méthodes basées sur la phylogénie génomique complète, offrant une précision accrue dans l'étude des relations évolutives (Bakhshi et al., 2021). L'affinage de la taxonomie a conduit à des avancées significatives dans le domaine de la phytopathologie et des interactions entre microbes et plantes (Cregger et al., 2021, Gilbert et Parker, 2016).

XF et BS appartiennent toutes deux au phylum des Pseudomonata et à la classe des Gammaproteobacteria (Tab. 1.1).

XF appartient à la famille des *Xanthomonadaceae* (Tab. 1.1), qui regroupe plus de 20 genres, parmi lesquels *Xanthomonas* et *Xylella* sont particulièrement bien connus. Cette famille est majoritairement composée de bactéries phytopathogènes, une spécificité attribuée, entre autres, à leur système de sécrétion de type III et à ses effecteurs associés, capables de détourner les défenses immunitaires des plantes et de perturber leurs processus cellulaires (Mhedbi-Hajri et al., 2011).

BS, initialement classée dans la famille des *Enterobacteriaceae* sur des bases phénotypiques, a été reclassée en 2016 dans la famille des *Pectobacteriaceae* suite à une refonte de la classification basée sur la phylogénétique moléculaire (Adeolu et al., 2016). Cette famille, qui regroupe principalement des bactéries phytopathogènes, comprend huit genres (*Acerihabitans*, *Biostraticola*, *Brenneria*, *Dickeya*, *Lonsdalea*, *Musicola*, *Pectobacterium* et *Sodalis*) tous isolés à partir de matériel végétal ou d'eaux

Table 1.1 – Taxonomie de XF et BS (CABI, 2022b, CABI, 2022a)

	<i>Xylella fastidiosa</i>	<i>Brenneria salicis</i>
Règne	Bactérie	Bactérie
Phylum	Pseudomonata	Pseudomonata
Classe	Gammaproteobacteria	Gammaproteobactéria
Ordre	Xanthomonadales	Entérobactérale
Famille	Xanthomonadaceae	Pectobacteriaceae
Genre	<i>Xylella</i>	<i>Brenneria</i>
Espèce	<i>Xylella fastidiosa</i>	<i>Brenneria salicis</i>
Sous-espèces	<i>pauca</i> , <i>multiplex</i> , <i>fastidiosa</i>	/

de surface (Hugouvieux-Cotte-Pattat et al., 2024).

Le genre *Xylella* inclut deux espèces : *X. taiwanensis* et *X. fastidiosa*. La première, isolée à Taïwan et responsable de la *Pear leaf scorch disease*, était initialement considérée comme une sous-espèce de XF mais a été reclassée en 2016 en raison de différences significatives au niveau des gènes utilisés pour la classification phylogénétique (Su et al., 2016). La seconde, XF, comprend actuellement trois sous-espèces officielles : *pauca*, *multiplex*, et *fastidiosa*.

Le genre *Brenneria* regroupe huit espèces : *B. alni*, *B. corticis*, *B. goodwinii*, *B. nigrifluens*, *B. populi*, *B. roseae*, *B. rubrifaciens* et BS. Ces espèces sont divisées en deux groupes : le groupe A et le groupe B. BS appartient au groupe B, aux côtés de *B. roseae* et *B. rubrifaciens* (Bakhshi et al., 2021). *B. roseae* et *B. rubrifaciens* ont respectivement été isolées de chênes présentant le *Acute oak decline syndrome* et de noyers affectés par le *Deep bark canker of walnut trees* (McClellan et Kluepfel, 2010, Sapp et al., 2016).

1.1.2 Biologie de XF et BS

XF et BS partagent des caractéristiques communes. Leur température de croissance optimale est similaire (Tab. 1.2). Elles sont toutes deux des bactéries Gram négatives, non sporulantes et dépourvues de flagelles (Tab. 1.2). Cependant, elles présentent une motilité active. XF se déplace par *twitching*, un mode de déplacement qui s'effectue sans flagelles grâce à l'extension, l'attachement puis la rétraction de pili polaires de type IV (Li et al., 2007). XF est aérobie stricte et se présente sous forme de bâtonnets de 0,1 à 0,5 µm de large et de 1 à 5 µm de long (Tab. 1.2). BS, quant à elle, est anaérobie facultative et se présente également sous forme de bâtonnets de 0,5 à 1 µm de large et de 1,3 à 3 µm de long (Tab. 1.2).

Table 1.2 – Tableau comparatif entre XF et BS où les lignes vertes correspondent aux caractéristiques communes chez XF et BS

	<i>Xylella fastidiosa</i>	<i>Brenneria salicis</i>
Gram	Gram-	Gram-
Taille cellulaire	0,1-0,5 × 1-5 µm	0,5-1,0 × 1,3-3,0 µm
Flagelle	Non	Non
Sporulation	Non	Non
Métabolisme	aérobie stricte	anaérobie facultative
T° optimale de croissance	26°C-28°C	26°C-28°C
Biofilm	Oui	/
Cycle de vie	Xylème-limitée	Colonisatrice du xylème
Transmission horizontale	Insectes piqueurs-suceurs du xylème	aérienne et hydrique
Transmission verticale	boutures et graines	boutures
Maladies	<i>Pierce disease of grape-vine, Phony peach disease, Plum leaf scald, Citrus variegated chlorosis, Olive quick decline syndrome</i>	<i>Watermark disease</i>

XF est une bactérie xylème-limitée capable de coloniser le xylème primaire et secondaire (De La Fuente et al., 2022, Sun et al., 2013), c'est-à-dire qu'elle ne peut survivre que dans le xylème et dans une zone bien précise de son insecte vecteur. BS, quant à elle, est une bactérie spécifique du xylème, ce qui signifie qu'elle peut survivre dans d'autres types de tissus avant d'atteindre et de coloniser le xylème (CABI, 2022b, De La Fuente et al., 2022). Par conséquent, ces deux bactéries présentent des mécanismes d'adaptation au xylème différents (De La Fuente et al., 2022).

Pour coloniser le xylème ou ses insectes vecteurs, XF est capable de passer par des états d'adhérence ou planctoniques en formant des biofilms (Li et al., 2007). Les biofilms sont des agrégats multicellulaires organisés au sein d'une matrice généralement auto-produite. Ils favorisent la signalisation, la communication et protègent les communautés bactériennes des stress environnementaux. L'évolution de la colonisation est régulée par un *quorum sensing*. Dans un premier temps, quelques bactéries pionnières se fixent au substrat grâce à des adhésines et d'autres structures membranaires. Chez XF, cette étape est assurée notamment par les pili de type I, essentiels à l'adhésion. Les pili de type IV interviennent également (Li et al., 2007, De La Fuente et al., 2007). Pour fonctionner correctement, ces pili nécessitent notamment une concentration

suffisante en ions Ca^{++} (Cruz et al., 2012). Après fixation, les bactéries se multiplient, s'agrègent et sécrètent des polymères extracellulaires tels que des protéines, des polysaccharides, des lipides et des Acide désoxyribonucléique (ADN) extracellulaire formant la matrice du biofilm. Enfin, le biofilm peut s'agrandir ou s'auto-détruire pour permettre aux bactéries de repasser en phase exploratoire (Li et al., 2007).

1.1.2.1 Transmission

BS et XF peuvent toutes deux se transmettre de manière horizontale et verticale. XF peut se transmettre par le bouturage et les graines (chez le pacanier uniquement), tandis que BS se transmet uniquement par le bouturage (Tab. 1.2) (Cervantes et al., 2022, CABI, 2022b, CABI, 2022a).

De manière horizontale, BS peut se transmettre par voie aérienne ou hydrique à travers des ouvertures naturelles (stomates) ou des blessures dans son hôte. Des insectes vecteurs sont également considérés comme vecteurs de BS bien que cela n'ait pas encore été prouvé (Pesenti, 2024). BS peut survivre dans des tissus morts pendant au moins 4 ans (Maes et al., 2009).

XF, quant à elle, nécessite des insectes piqueurs-suceurs du xylème pour se transmettre horizontalement (Tab. 1.2) (Cervantes et al., 2022, CABI, 2022b, CABI, 2022a, Chatterjee et al., 2008). XF étant incapable de survivre hors de ces insectes ou du xylème, ceux-ci ont un rôle essentiel au cycle de vie de XF. La majorité des insectes vecteurs ou potentiellement vecteurs de XF appartiennent à l'ordre des Hémiptères, notamment aux familles *Cercopidae*, *Cicadellidae*, *Cicadidae* et *Machaerotidae*. Ces insectes, peu spécifiques, sont répartis sur la presque totalité des terres émergées. Ce manque de spécificité des vecteurs accroît le risque d'introduction et d'établissement durable de XF dans des zones où elle est absente. La bactérie atteint l'insecte lorsqu'il se nourrit sur une plante infectée. Une fois fixée, XF prolifère dans le précibarium en formant des biofilms. Après environ 8 heures, la densité bactérienne atteint son pic, variant entre 50 000 et 100 000 bactéries selon l'insecte. XF ne colonise pas l'insecte au-delà du précibarium, ce qui empêche son passage dans l'hémolymphe ou les organes internes, faisant d'elle un pathogène transmis de manière non circulative et non persistante. La colonisation du précibarium est transitoire, car lors de la mue, la cuticule ectodermique de celui-ci est renouvelée, éliminant ainsi le biofilm. Pour redevenir vecteur, l'insecte doit se nourrir à nouveau sur une plante infectée après chaque mue (Cornara et al., 2019).

1.1.2.2 Plantes hôtes

Les plantes hôtes symptomatiques de BS sont exclusivement des espèces du genre *Salix*, comme *S. alba* et *S. fragilis* (CABI, 2022a). BS colonise également les genres

Populus et *Alnus*, mais sans engendrer de symptômes particuliers (Huvenne et al., 2009).

XF, quant à elle, est beaucoup moins exclusive. Elle peut coloniser des genres extrêmement variés. Actuellement, elle a été isolée ou séquencée à partir de 451 espèces végétales réparties dans 204 genres et 70 familles, incluant des herbacées et des ligneuses. Parmi elles figurent des familles importantes comme les *Salicaceae*, *Oleaceae*, *Vitaceae*, *Rosaceae*, *Fabaceae*, *Brassicaceae* et *Poaceae* (EFSA et al., 2024, CABI, 2022b). Les estimations incluant les hôtes potentiels de XF dépassent 700 espèces appartenant à 89 familles différentes (EFSA et al., 2024).

Il est important de noter que XF et BS partagent les genres *Salix* et *Populus* comme hôtes potentiels.

1.1.2.3 Symptômes

Chez les hôtes sensibles, une infection par BS dans le xylème peut entraîner la *Watermark disease*. Le délai entre la colonisation bactérienne et l'apparition des symptômes liés à cette infection est très variable. Les premiers signes incluent le flétrissement des feuilles distales des branches au sommet de la cime. Ces feuilles, passant du vert au rouge-brun, restent accrochées aux branches de printemps à l'été. Ce symptôme, souvent discret, passe inaperçu. Au fil des années, les branches infectées dépérissent, et d'autres feuilles présentent les mêmes symptômes. Une section transversale des branches touchées révèle des taches rougeâtres à noirâtres dans le bois, normalement blanc, d'où le nom *Watermark*. Ces taches peuvent apparaître sous forme de zones irrégulières. À terme, un arbre infecté et symptomatique finit par mourir (CABI, 2022a, Maes et al., 2009).

Chez XF, les symptômes varient selon l'hôte et sont généralement liés à une occlusion partielle des vaisseaux du xylème. Les premiers signes peuvent être confondus avec des facteurs abiotiques ou d'autres agents biotiques. Le délai entre l'inoculation et l'apparition des symptômes peut aller de quelques mois à plus d'un an, en fonction de l'espèce et de son âge. Le symptôme le plus caractéristique est une brûlure foliaire précédée par une chlorose en bordure des feuilles. Le dessèchement s'étend ensuite, entraînant le flétrissement et la chute du limbe, tout en laissant le pétiole attaché. Les tiges malades mûrissent de manière irrégulière. Plus tard, les plantes infectées montrent un retard de croissance, des feuilles chlorotiques plus petites et des branches faibles. Les cultivars les plus sensibles survivent rarement au-delà de 2 à 3 ans après l'infection. Chez les vignes, les jeunes plants succombent plus rapidement que les plants plus âgés (CABI, 2022b, EFSA et al., 2018).

1.1.2.4 BS et XF comme endophytes

BS et XF peuvent adopter un comportement pathogène ou endophyte au sein de leur hôte, un phénomène partiellement attribué à l'absence d'un système de sécrétion de type III (SST3) chez ces deux bactéries. Les SST3, essentiels chez de nombreux phytopathogènes, permettent l'injection d'effecteurs dans les cellules végétales, bloquant ainsi les réponses immunitaires induites (Maes et al., 2009, Roper et al., 2019).

BS présente même des traits de bactéries promotrices de croissance des plantes (PGP). Maes et al. ont montré qu'en faibles concentrations, BS favorise significativement la production de chlorophylle chez les saules. La surpopulation de BS dans le xylème, responsable de symptômes, est influencée par des facteurs abiotiques comme les saisons, les traces d'herbicides ou les niveaux d'azote dans le sol. Bien que la fertilisation azotée stimule la croissance des saules, elle les rend plus sensibles à BS (Hanneke et al., 2009).

Selon Roper et al. (2019), l'absence de SST3 chez XF pourrait refléter une évolution dégénérative par rapport aux autres pathogènes de la même famille. Ce mode de vie aurait permis à XF de coloniser un large éventail d'espèces végétales sans les affecter. De plus, le *quorum sensing* de XF exprime parfois des comportements antivirulents, tels que la limitation de sa dispersion ou la production de vésicules de membrane externe (OMVs) qui réduisent son adhérence aux parois du xylème (Roper et al., 2019).

1.1.3 Importance économique, écologique et méthode de lutttes

1.1.3.1 Distribution géographique

XF est endémique au continent américain. Les sous-espèces *fastidiosa*, *multiplex* et *pauca* sont respectivement originaires d'Amérique centrale, d'Amérique du Nord et d'Amérique du Sud (CABI, 2022b). Cependant, la mondialisation a récemment permis à XF de se répandre sur d'autres continents comme l'Asie et l'Europe (1.1).

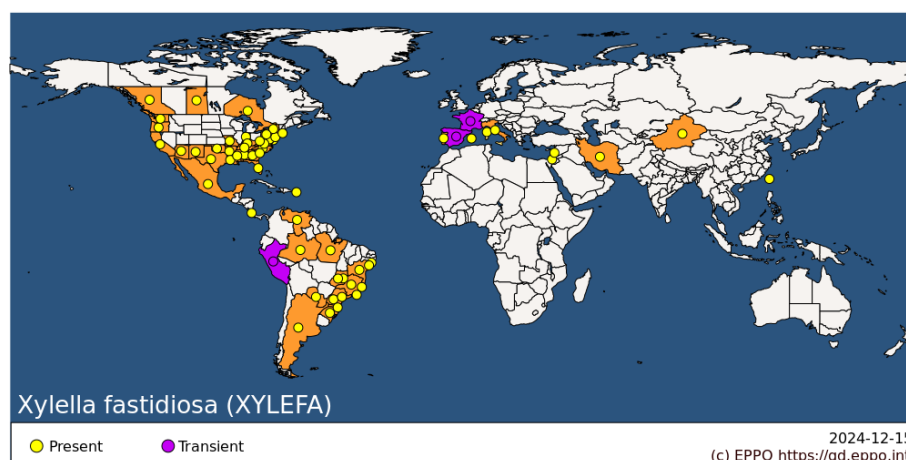


Figure 1.1 – Distribution géographique de XF. En jaune la bactérie est considérée comme installée et en rose comme contenue (EPPO, 2024).

La première détection et caractérisation de BS a été faite au début du 20^{ème} siècle au Royaume-Uni. Aujourd'hui, la bactérie est recensée aux Pays-Bas, en Belgique, en Autriche, en Hongrie, en Italie, en Iran et au Japon (CABI, 2022a).

1.1.3.2 Impact économique

Les impacts économiques de XF sont majeurs. Les pertes les plus importantes concernent les cultures de vigne, d'agrumes, d'amandes, d'olivier et de café. En 2023, l'EFSA estime une perte potentielle de production annuelle de 5,5 milliards d'euros, affectant 70 % de la production des oliviers de plus de 30 ans, 11 % des agrumes, 13 % des amandes et 1 à 2 % de la production de raisins, dans un scénario où la propagation de XF serait totale à l'échelle de l'Europe. Ces différents secteurs représentent près de 300 000 emplois en Europe (EFSA, 2023).

BS a eu un impact économique significatif dans les années 1930 sur l'industrie des battes de cricket au Royaume-Uni, en décimant des plantations de saules (Hanneke et al., 2009). Aujourd'hui, il n'existe pas de chiffres précis concernant l'impact économique actuel de cette bactérie. Les pertes de production de bois de saule liées à BS se seraient stabilisées à partir de 1980 à environ 0,5 %, grâce aux méthodes prophylactiques développées (CABI, 2022a).

1.1.3.3 Méthodes de lutte

Aujourd'hui, aucun traitement applicable n'a été développé pour éliminer XF et BS des plantes infectées. Néanmoins, différentes stratégies prophylactiques existent contre ces bactéries (EFSA et al., 2019, Pesenti, 2024). Pour les deux bactéries,

le développement et l'utilisation de cultivars résistants à permettent de réduire la pression exercée par ces pathogènes (EFSA et al., 2019, Pesenti, 2024). La surveillance des plantations est essentielle pour repérer les premiers signes d'infection et contenir rapidement la maladie (EFSA et al., 2019, Pesenti, 2024). Les infections de BS peuvent également être gérées en élaguant les branches infectées. Les outils doivent ensuite être désinfectés entre chaque coupe pour éviter les contaminations croisées (Pesenti, 2024).

En Europe, afin de contenir au maximum la propagation de XF, cet organisme a été classé comme organisme de quarantaine. Cela signifie que son introduction dans un État membre est interdite. De plus, la législation concernant l'introduction d'espèces hôtes sur le territoire est très stricte. Les États membres sont tenus de mener des enquêtes annuelles visant à déceler la présence ou non de l'organisme sur leur territoire.

Les mesures à suivre par un État membre en cas d'infection par XF sont expliquées par l'EFSA. Les plus importantes sont reprises ci-dessous de manière non exhaustive.

1. L'État membre doit définir une *zone délimitée* composée d'une zone dite infectée et d'une zone tampon pouvant s'étendre à une dizaine de kilomètres autour de la première. Ces zones sont établies notamment par un diagnostic rigoureux qui comprend le recensement de tous les végétaux infectés, de ceux présentant des symptômes, et des potentiels hôtes à proximité des végétaux infectés.
2. Dans un rayon de 100 m autour de la zone infectée, l'État membre est tenu de procéder à l'enlèvement et à la destruction immédiate de tous les végétaux infectés et des hôtes, quel que soit leur statut.
En amont de cet enlèvement, un traitement phytosanitaire approprié aux vecteurs doit être réalisé.
3. Une enquête doit être menée pour déterminer l'origine de l'infection.
4. Les zones tampons sont ensuite soumises à une enquête quadrillée pour détecter la présence ou l'absence de XF. Des enquêtes annuelles doivent également être menées dans ces zones (EFSA, 2024).

1.2 Les Salicacées

Les *Salicaceae* (Salicacées) appartiennent au règne des plantes. Elles sont incluses dans le sous-règne des trachéophytes, c'est-à-dire les plantes à tissus conducteurs différenciés : le xylème et le phloème, assurant respectivement la circulation de la sève xylémienne et phloémienne. Les Salicacées sont des angiospermes. Elles sont donc affiliées à la classe des magnoliopsides. Enfin, elles font partie et représentent

un huitième de l'ordre des malpighiales (Catalogue of Life, 2023).

1.2.1 Répartition, origines et anatomie

Les Salicacées comprennent des arbres ou arbustes répartis sur toutes les latitudes du globe. Elles sont donc adaptées à un large spectre de climats. La grande majorité des espèces se trouve dans les régions tempérées et subtropicales de l'hémisphère Nord (Eckenwalder et al., 1996). Ces arbres ont un pool génétique commun remontant à environ 68 millions d'années, situé du côté de l'Asie australe (Shuangxing et al., 1985). Cette période correspond au passage de l'Éocène (-56 à -34 millions d'années) à l'Oligocène (-34 à -23 millions d'années), marqué par une brusque baisse des températures sur Terre, ce qui a mené à une extinction de masse et, par conséquent, à un renouvellement des flores dans les différentes régions du monde (Liu et al., 2022). Avec ce renouvellement, la spéciation de la famille des *Salicaceae* a commencé. Jusqu'à aujourd'hui, en plus des inévitables spéciations sympatriques et parasymphatriques, les événements géologiques et climatiques tels que l'élévation du plateau tibétain (barrière physique), le pont de Béring (pont physique), et les variations successives globales et locales des températures ont considérablement favorisé les spéciations péri- et allopatriques des Salicacées (Liu et al., 2022).

Ce court historique de l'évolution des Salicacées permet d'expliquer certaines des caractéristiques biologiques de cette famille ainsi que son importance écologique dans l'hémisphère Nord. En effet, bien que cette famille se retrouve partout sur le globe, la plupart des espèces se situent dans l'hémisphère Nord et sont donc adaptées à de nombreux biotopes de climats tempérés humides. Cela explique la croissance généralement rapide des Salicacées, faisant d'elles des espèces pionnières. La famille des Salicacées a des feuilles caduques, pétiolées, simples et alternes. Dioïques ou hermaphrodites, les inflorescences appelées chatons sont composées de petites fleurs apétales et asépales (Simpson, 2010, Fisher, 1928).

Parmi la cinquantaine de genres appartenant aux *Salicaceae*, ce sont les genres *Salix* et *Populus* qui dominent dans l'hémisphère Nord. En effet, même au sein de la littérature scientifique, ceux-ci sont souvent cités comme étant les deux seuls genres appartenant à la famille des Salicacées, alors qu'ils constituent ensemble 50% des espèces des Salicacées (Catalogue of Life, 2023, Fisher, 1928). Cela s'explique par l'évolution des méthodes de classification phylogénétique récentes, mais également par l'ubiquité des *Salix* et *Populus* dans l'hémisphère Nord, elle-même induite par leur grande adaptabilité aux différents biotopes et climats. Avant de se concentrer

sur ces deux genres pour répondre à la question de recherche, par souci d'attention, quelques genres peu recensés mais néanmoins importants des Salicacées sont énoncés ci-dessous :

1. Le genre *Casearia*, adapté au climat tropical, se retrouve principalement en Amérique du Sud et en Afrique. Ce genre représente environ 15% des espèces des Salicacées (Sleumer, 1971).
2. Le genre *Homalium*, adapté au climat tropical, se retrouve principalement en Amérique du Sud et en Afrique. Ce genre représente environ 10% des espèces des Salicacées (Pais et al., 1973).
3. Le genre *Xylosma*, adapté au climat tropical, est distribué en Asie, en Amérique centrale et en Amérique du Sud. Ce genre représente un peu moins de 10% des espèces des Salicacées (G. Forst, 2023).

1.2.2 *Salix* et *Populus*

De par leur adaptation aux différents biotopes de l'hémisphère Nord, les saules (*Salix* spp.) et peupliers (*Populus* spp.) jouent un rôle essentiel dans les écosystèmes européens, tout en ayant une importance économique significative et une histoire riche. Cultivés depuis des siècles, ces arbres se démarquent par leur polyvalence, leur croissance rapide et leur adaptabilité. Aujourd'hui, ils continuent de contribuer à divers secteurs économiques, notamment le bois, la bioénergie et l'agroforesterie, tout en étant au cœur de nombreux programmes de recherche.

1.2.2.1 Contexte historique en Europe

Les saules et peupliers sont utilisés en Europe depuis l'Antiquité. Au fil des siècles, ils ont répondu aux besoins de nombreuses civilisations pour le bois de chauffage, la construction et notamment la médecine (Isebrands et Richardson, 2014). En effet, on retrouve dans la sève de saule plus de 300 métabolites secondaires. Parmi ceux-ci, beaucoup ont des applications pharmacologiques variées. Les Grecs l'avaient bien compris et utilisaient, par exemple, les feuilles de peuplier pour soulager certaines douleurs. Cette pratique a mené, plus tard, à la découverte de la salicine, le précurseur de l'aspirine moderne (Isebrands et Richardson, 2014, Andrei et al., 2024). Avec la montée des besoins en bois pendant l'ère industrielle, la culture de peupliers a gagné en popularité en Europe (Isebrands et Richardson, 2014).

La demande en bois de peuplier a également influencé les politiques forestières de nombreux pays d'Europe aux 19^e et 20^e siècles, avec la mise en place de programmes de sélection et de cultures intensifiées. Ces initiatives se sont accélérées lors de la

création de la Commission Internationale des Peupliers en 1947 par l'Organisation des Nations Unies pour l'alimentation et l'agriculture (FAO), afin de coordonner les efforts de gestion durable des ressources en peupliers et saules en Europe et ailleurs. Cette commission vise à coordonner les efforts de gestion durable des saules et peupliers à travers le monde (Isebrands et Richardson, 2014).

1.2.2.2 Contexte économique en Europe

Les saules et peupliers sont économiquement précieux en Europe pour différents secteurs :

1. Production de bois et contreplaqué : Les peupliers cultivés produisent du bois léger et flexible, idéal pour la fabrication de contreplaqué, de panneaux de fibres de densité moyenne (MDF).
2. Bioénergie : Le bois de peuplier est de plus en plus utilisé pour le chauffage en Europe grâce à sa croissance rapide et à sa compétitivité avec le gaz naturel et le pétrole.
3. Agronomie : Ils sont utiles pour stabiliser les sols et lutter contre l'érosion.
4. Phytoremédiation : Grâce à leur capacité d'absorption de métaux lourds et de polluants, les saules et peupliers sont plantés dans des sites contaminés pour restaurer la qualité des sols.

1.2.2.3 Importance écologique

Au-delà de leur importance économique, les saules et peupliers jouent également un rôle écologique crucial. Ils sont essentiels pour la régulation des cycles hydrologiques des zones humides et des écosystèmes riverains et ripariens. Ils permettent de stabiliser les sols et les berges contre l'érosion (Isebrands et Richardson, 2014). Généralement, les zones habitées par ce type d'arbre sont extrêmement riches en biodiversité. En effet, ils servent d'habitat ou de sources de nourriture pour de nombreuses espèces végétales, de petits mammifères, d'oiseaux, d'insectes, de champignons et de lichens (Isebrands et Richardson, 2014).

1.2.2.4 Organismes modèles

Les peupliers et saules ont également une place centrale dans la recherche, notamment dans les domaines de la génétique, de la biotechnologie et de l'écologie.

Leur génome relativement simple (environ 500 millions de paires de bases pour 19 paires de chromosomes), leur rapidité de croissance, la possibilité de les cloner par bouturage, leur ubiquité, ainsi que leur intérêt écologique et agronomique ont fait de nombreuses espèces de ces organismes des modèles pour la recherche en génomique et en biologie végétale (Isebrands et Richardson, 2014, Tuskan et al., 2006, Cregger et al., 2021). En conséquence, *Populus trichocarpa* a été la première espèce arbustive séquencée, assemblée et annotée dans l'histoire. Aujourd'hui, les ressources génomiques sont vastes dans la littérature. Actuellement, il existe des génomes de référence annotés pour le genre *Populus* (*P. trichocarpa*, *P. euphratica*, *P. pruinosa*, *P. alba* var. *pyramidalis*, *P. alba*, *P. tremula* et *P. tremuloides*). Concernant les saules, seuls deux génomes annotés sont actuellement référencés en ligne (*S. purpurea* et *S. suchowensis*), traduisant un léger retard (Wei et al., 2020). Cela signifie qu'à ce jour, près de 30% des espèces de peupliers ont été séquencées et annotées, contre seulement 0,5% pour les espèces saules.

En raison des éléments évoqués ci-dessus, *Salix* et *Populus* sont d'excellents modèles pour étudier les interactions plantes-microbes (Cregger et al., 2021).

1.2.2.5 Hôtes potentiels pour XF et BS en Belgique

Il a été démontré que les espèces *Populus tremula*, *Populus canescens*, *Salix alba* et *Salix caprea* sont bien implantées en Belgique. Elles ont également été identifiées comme des hôtes potentiels pour XF en Belgique, ainsi que pour certains de ses insectes vecteurs (Casarin et al., 2023). Parmi ces espèces, *S. caprea* et *S. alba* sont également des hôtes naturels pour BS (Maes et al., 2009).

Ces différentes essences bordent majoritairement les cours d'eau en Belgique et représentent ensemble 2 à 8% des forêts wallonnes, mais elles sont tout de même distribuées de manière assez homogène sur l'ensemble du territoire. À titre de comparaison, les frênes peuvent représenter jusqu'à 30% de certaines forêts wallonnes, mais ne sont pas distribués de manière aussi homogène sur le territoire. Par exemple, ils sont presque absents du plateau ardennais (GIM et al., 2019). La distribution de ces espèces sur le territoire belge et leur lien avec des insectes vecteurs de XF constitue donc un risque important quant à la rapidité de la propagation de la bactérie (Casarin et al., 2023).

1.3 Généralités sur le xylème et les microorganismes associés

1.3.1 Structure et propriétés physicochimiques du xylème

Le xylème est constitué de cellules distinctes dotées de structures pariétales spécialisées, permettant un transport efficace de l'eau et des solutés depuis les racines jusqu'aux parties supérieures de la plante. En plus de ce rôle de transport, le xylème fournit à la plante une structure et un soutien physique solide à la plante. Son développement se déroule en deux phases : le xylème primaire, constitué de trachéides, et le xylème secondaire, composé d'éléments de vaisseaux lignifiés (Zimmermann, 2013, Yadeta et J. Thomma, 2013).

Les trachéides forment un empilement vertical de cellules à extrémités biseautées sans perforation. À maturité, le xylème est composé de trois types cellulaires distincts : les éléments trachéaires (éléments de vaisseaux et trachéides), les fibres et les cellules parenchymateuses. Les fibres assurent un rôle structural et de soutien, tandis que les cellules parenchymateuses, métaboliquement actives, participent au stockage et au transport de l'eau (Zimmermann, 2013, Yadeta et J. Thomma, 2013).

Les éléments de vaisseaux du xylème ressemblent à des tubes d'environ 100 μm de diamètre, de longueur variable (allant de plusieurs dizaines de centimètres à plusieurs mètres), disposés parallèlement les uns aux autres. Les extrémités adjacentes des vaisseaux sont pourvues de plaques de perforation ouvertes, facilitant leur connexion (Zimmermann, 2013). Ces vaisseaux sont également connectés latéralement par des membranes criblées jouant un rôle de filtre, avec des ouvertures inférieures à 20 μm (Zimmermann, 2013).

Le transport de l'eau et des solutés dans le xylème est rendu possible par le processus de transpiration, qui génère des pressions hydrostatiques négatives influant sur le potentiel hydrique. Ce mécanisme permet ainsi le transport de la sève dans les vaisseaux du xylème. La pression négative dans le xylème résulte de l'évaporation de l'eau au niveau des feuilles et de la diffusion de la vapeur d'eau à travers les stomates. Les plantes vasculaires sont les seuls organismes capables de transporter l'eau sous pression négative tout en minimisant la formation de bulles de gaz. D'un point de vue thermodynamique, l'eau devrait passer en phase gazeuse dans ces conditions extrêmes, une contradiction qui reste partiellement inexplicée. La théorie de la cohésion-tension, formulée au 19^e siècle, offre une explication, mais elle demeure débattue. Les détails structuraux du xylème, tels que les membranes criblées et les forces capillaires, ainsi que certains lipides présents dans la sève et sur les surfaces des

vaisseaux, contribueraient à maintenir les bulles de gaz en dessous des seuils critiques pouvant provoquer des embolies destructrices (Zimmermann, 2013, De La Fuente et al., 2022).

1.3.2 Microbes et sève xylémienne

La sève xylémienne présente une faible teneur en composés organiques, minéraux et protéiques par rapport aux autres tissus de la plante. Elle contient plus de 110 éléments différents (Lowe-Power et al., 2018a), dont certains, essentiels à la survie des bactéries, sont présents en concentrations très faibles par rapport aux autres organes de la plante. Cependant, des acides aminés comme la glutamine et l'asparagine y sont retrouvés en plus grande concentration que dans les autres tissus.

La composition de la sève xylémienne varie selon plusieurs facteurs : le substrat sur lequel pousse la plante, les saisons, les cycles journaliers, ainsi que les différences inter- et intra-spécifiques.

Les organismes présents dans le xylème doivent donc être capables d'exploiter efficacement les nutriments en solution pour assurer leur développement (Purcell et Hopkins, 1996). Les microbes xylémiens adoptent des stratégies chimiques ou biologiques pour récupérer ces nutriments. Les stratégies chimiques consistent à augmenter la biodisponibilité des nutriments grâce à des sidérophores ou d'autres chélateurs (De La Fuente et al., 2022, Purcell et Hopkins, 1996). Les stratégies biologiques, quant à elles, impliquent des mécanismes permettant de manipuler ou dégrader les tissus de la plante afin de libérer ou produire des composés utiles aux bactéries (Ingel et al., 2022, Lowe-Power et al., 2018b).

1.3.2.1 Bactéries phytopathogènes du xylème

Parmi les bactéries phytopathogènes du xylème, deux groupes principaux peuvent être distingués : les bactéries xylème-limitées et les bactéries colonisatrices du xylème.

Les bactéries xylème-limitées ne survivent pas dans d'autres tissus de la plante et doivent être transportées directement dans le xylème. Elles sont exclusivement transmises par inoculation mécanique directe dans le xylème par des insectes piqueurs-suceurs (Purcell et Hopkins, 1996, De La Fuente et al., 2022). Les bactéries colonisatrices du xylème, quant à elles, peuvent passer une partie de leur cycle de vie dans d'autres tissus végétaux avant d'atteindre le xylème, où leur virulence s'exerce principalement (De La Fuente et al., 2022).

Les bactéries phytopathogènes du xylème colonisent les vaisseaux xylémiens et/ou

les cellules du xylème. Elles peuvent montrer une spécificité pour certains tissus ou types cellulaires. Les symptômes apparaissent généralement lorsque ces bactéries s'accumulent dans une zone spécifique (Purcell et Hopkins, 1996).

Leur virulence ne repose pas uniquement sur la production de toxines. Elle inclut également l'occlusion des vaisseaux (via des biofilms ou par la réponse immunitaire de l'hôte), la production d'enzymes dégradant les parois cellulaires, ou encore la modification de l'ionome de la sève xylémienne (De La Fuente et al., 2022).

1.3.2.2 Réponse du xylème face aux agents phytopathogènes

En réponse aux agents pathogènes, différents mécanismes de défense associés au xylème se mettent en place. Ces mécanismes, qu'ils soient physiques ou chimiques, permettent soit de contenir l'infection, soit d'éliminer les bactéries. Ils sont coordonnés par les cellules parenchymateuses adjacentes aux éléments de vaisseaux colonisés et varient selon les espèces végétales (Gluck-Thaler et al., 2020).

Les défenses physiques incluent notamment la production et le dépôt de callose, ainsi que la formation de tyloses. Les tyloses sont des excroissances des cellules parenchymateuses du xylème qui s'étendent dans les vaisseaux pour bloquer le mouvement de l'eau. Ce phénomène peut entraîner des embolies d'air. Bien que l'obstruction des vaisseaux limite la propagation des pathogènes, elle peut également affecter la plante à long terme (Zimmermann, 2013, Gluck-Thaler et al., 2020, De La Fuente et al., 2022).

Les défenses chimiques se manifestent par l'accumulation ou la production de métabolites secondaires antagonistes (par exemple, des peroxydes), de protéines (comme les chitinases et les -1,3-glucanases), de composés phénoliques (comme l'oleuropéine et le tyrosol), ou encore de composés soufrés (Gluck-Thaler et al., 2020).

1.3.3 L'endophytome

Le concept d'endophytome, redéfini par Lengrand et Pesenti (2024), s'inspire de la définition du microbiome humain afin d'englober l'ensemble des micro-organismes vivant à l'intérieur des tissus végétaux. Celui-ci se définit comme la communauté d'endophytes (tous microbes confondus) habitant les plantes en tant qu'organismes obligatoires ou facultatifs. Par conséquent, l'endophytome n'exclut aucun micro-organisme en raison de ses relations avec son hôte, pouvant être associées au mutualisme, au commensalisme, à la rhizophagie, à l'amensalisme, au parasitisme ou à la compétition (Lengrand et Pesenti, 2024). Un endophytome dit "sain" se réfère à la présence d'un microbiome en l'absence de toute maladie et présente un large degré

de diversité, pouvant être façonné par la plante hôte, son stade de développement et son environnement. L'endophytome peut également être caractérisé comme un noyau fonctionnel ou un complément de fonctions métaboliques et moléculaires qu'il assure au sein de la plante, ces fonctions n'étant pas nécessairement assurées par les mêmes organismes chez des espèces ou individus différents (Lengrand et Pesenti, 2024).

Il est prouvé qu'un endophytome sain est essentiel pour le développement des plantes, leur santé ainsi que leur protection contre les stress biotiques et abiotiques (sécheresse, pollution, pauvreté du sol, etc.) (Lengrand et Pesenti, 2024, Fatima et al., 2024).

1.3.3.1 Étude de l'endophytome

La caractérisation de l'endophytome peut être réalisée par différentes méthodes complémentaires. Elle peut se concentrer au niveau des individus en caractérisant les traits PGP ou au niveau de l'étude de l'ensemble de l'endophytome.

Généralement, les traits PGP étudiés concernent la production de métabolites utiles pour la plante par les endophytes. La capacité à solubiliser le phosphate ou à produire des sidérophores est souvent évaluée. Les traits caractérisant la capacité à atténuer les stress abiotiques et biotiques incluent la production de phytohormones, telles que l'auxine, l'acide gibbérellique, l'acide abscissique, la cytokinine, l'acide jasmonique, l'éthylène et l'acide salicylique (Fatima et al., 2024). L'activité antimicrobienne peut également être évaluée via des tests de confrontation avec des pathogènes, où le taux d'inhibition est mesuré. L'inhibition des pathogènes *in vitro* peut être attribuée à la production d'enzymes lytiques et d'antibiotiques. *In vivo*, les organismes peuvent, en plus de leurs métabolites antagonistes aux bactéries phytopathogènes, moduler l'expression des gènes de la plante en induisant notamment la résistance systémique de celle-ci (Fatima et al., 2024).

Pendant longtemps, et encore aujourd'hui, la caractérisation des microbiomes a été réalisée par une méthode dite "culture-dépendante". Celle-ci implique l'isolement et la culture des individus récupérables via différents milieux de culture. Cependant, selon Pace (2018), seule une bactérie sur mille provenant d'échantillons environnementaux peut être cultivée de manière traditionnelle (Medeiros Azevedo et al., 2021). L'utilisation de plusieurs milieux de culture différents permet d'élargir la sélectivité de la méthode culture-dépendante. La métagénomique, qui consiste à analyser les acides nucléiques d'un extrait de l'organe cible, s'émancipe de ces méthodes et ouvre de nouvelles perspectives (Medeiros Azevedo et al., 2021).

Quelques-uns des outils utilisés pour caractériser l'ensemble de l'endophytome in-

cluent le séquençage métagénomique, le séquençage méta-transcriptomique et le séquençage d'amplicons spécifiques (Fatima et al., 2024).

Le séquençage métagénomique consiste à séquencer l'intégralité de l'ADN présent dans un échantillon, qu'il soit microbien ou appartenant à l'hôte. Les avantages de cette méthode sont qu'elle permet de découvrir l'ensemble de la diversité génétique d'un échantillon, y compris les micro-organismes non cultivables. Cette approche permet également d'identifier les gènes fonctionnels des micro-organismes présents et d'avoir une vue d'ensemble de la communauté microbienne (Fatima et al., 2024). Cependant, cette méthode présente des inconvénients : son coût élevé et la quantité massive de données générées. De plus, les séquences de l'hôte et les contaminants potentiels rendent l'analyse complexe (Fatima et al., 2024).

Le séquençage méta-transcriptomique consiste à cibler tous les acides ribonucléiques (ARN) présents dans un échantillon. Bien que cette méthode soit également coûteuse, elle fournit des informations sur l'activité fonctionnelle de l'endophytome en révélant les gènes exprimés à un moment donné, permettant ainsi de mieux comprendre les interactions entre les microbes et la plante hôte. Les limites de cette approche concernent principalement la stabilité de l'ARN (moins stable que l'ADN) et l'aspect temporel de la méthode. En effet, les résultats reflètent uniquement l'expression des gènes à un moment précis, sans tenir compte des variations temporelles ou environnementales (Fatima et al., 2024).

Le séquençage d'amplicons repose généralement sur l'amplification PCR de régions V1 à V9, et principalement, sur les régions V3-V4 et/ou V4-V5, du gène ARNr16S pour les bactéries et des gènes ITS1 et ITS2 pour les champignons (Fadeev et al., 2021, Fatima et al., 2024). Cette méthode est peu coûteuse, rapide, et peut fournir des informations sur les organismes présents en faible abondance. Cependant, une des limites de cette approche réside dans la région amplifiée, qui n'offre pas toujours une résolution taxonomique suffisante, ce qui peut entraîner des identifications incomplètes ou incorrectes (Fatima et al., 2024).

1.3.3.2 Interactions entre le Microbiote xylémien et BS et XF

BS et XF interagissent avec le microbiote xylémien de différentes manières. Par exemple, les arbres symptomatiques atteints de la *Watermark disease* suite à une infection par BS présentent une concentration bactérienne environ 10^7 fois supérieure à celle observée lorsque BS est présente sous une forme asymptomatique (Maes et al.,

2009). Cela souligne l'importance du microbiote xylémien dans la modulation de la pathogenèse de BS.

Concernant XF, plusieurs études ont caractérisé la diversité du microbiote de cultures infectées par cette bactérie, mettant en évidence des changements significatifs dans le microbiote xylémien en réponse à l'infection (Landa et al., 2022). Par exemple, le microbiote des vignes infectées par XF est dominé par des bactéries appartenant au phylum des *Proteobacteria* et des champignons des *Ascomycota* (Landa et al., 2022). Il a également été observé que l'augmentation des populations de *Pseudomonas fluorescens* et de *Achromobacter xyloxiidans* réduit les populations de XF dans les vignes asymptomatiques (Landa et al., 2022). Chez les agrumes, le développement de la *Citrus variegated chlorosis* est corrélé à un déséquilibre entre les espèces *Methylobacterium* et *Curtobacterium* (Landa et al., 2022). Cependant, les mécanismes par lesquels XF influence le microbiote de son hôte restent mal documentés (Landa et al., 2022).

En ce qui concerne l'influence positive des microbes xylémiens contre XF, les mécanismes de protection de l'hôte peuvent être associés à deux stratégies : les interactions microbiennes et la stimulation de l'immunité végétale (Landa et al., 2022). Par exemple, des espèces des genres *Methylobacterium* et *Curtobacterium* inhibent XF *in vitro* et empêchent l'apparition de symptômes chez *Catharanthus roseus* (Landa et al., 2022). Un exemple de stimulation de l'immunité végétale est fourni par la bactérie *Paraburkholderia phytofirmans* PsJN, capable d'inhiber la colonisation de la vigne par XF en activant les défenses immunitaires de la plante (Esmaeel et al., 2018).

Au niveau du microbiote dans sa globalité, il a été démontré que les oliviers résistants à l'*Olive quick decline syndrome* présentent une richesse et une diversité microbienne plus élevées que les oliviers sensibles (Landa et al., 2022). Chez des oliviers résistants et infectés par XF, le microbiote xylémien est fortement enrichi en endophytes des genres *Sphingomonas*, *Methylobacterium*, *Micrococcus* et *Curtobacterium*. Cependant, seuls et *in vitro*, aucun de ces endophytes ne présentait d'activité antagoniste contre XF (Zicca et al., 2020).

L'ensemble de ces études montre que le microbiote xylémien joue un rôle crucial dans l'interaction entre des bactéries phytopathogènes comme XF et BS et leurs hôtes. Une meilleure compréhension de ces interactions pourrait ouvrir la voie à

des stratégies de gestion innovantes exploitant les communautés microbiennes pour protéger les plantes hôtes.

Chapitre 2

Objectifs

Ce mémoire vise à contribuer à l'avancement des connaissances sur les moyens de lutte contre les pathogènes XF et BS au sein de leurs plantes hôtes, notamment dans la famille des *Salicaceae* (genres *Salix* et *Populus*). L'étude ambitionne également de mieux comprendre les facteurs déterminant les comportements pathogènes ou endophytes de ces bactéries. Enfin, ce travail entend fournir des données significatives sur le microbiote xylémien de ces arbres, qui sont à la fois largement répandus dans les régions tempérées et cruciaux pour la propagation de XF et BS.

Objectifs spécifiques

Pour répondre à ces ambitions, les objectifs spécifiques sont les suivants :

1. Observer les interactions entre les pathogènes et les endophytes antagonistes :

Étudier les interactions *in vivo* entre XF, BS et sept endophytes antagonistes potentiels, en utilisant des plants de tabac comme système modèle. Ces endophytes seront génétiquement transformés pour exprimer des marqueurs fluorescents, facilitant leur observation par microscopie confocale. Les plantes seront ensuite co-inoculées avec les pathogènes et les endophytes afin d'observer leur comportement interactif. L'un des enjeux de ce mémoire est également de réfléchir à la manière d'améliorer ces protocoles en cas de non-aboutissement de l'un ou plusieurs des objectifs énoncés plus haut.

2. Caractériser le microbiote xylémien des saules et peupliers :

Explorer le microbiote xylémien des *Salicaceae* par deux approches complémentaires :

- Analyse métagénomique de la sève xylémienne pour évaluer les communautés microbiennes. Les essais préliminaires mettent en évidence des défis liés à la faible quantité d'ADN, la présence d'inhibiteurs et de contaminants.
- Identification de plus de 400 endophytes précédemment isolés sur différents milieux à partir de sève xylémienne, permettant une caractérisation détaillée et milieu-dépendante du microbiote xylémien.

Impact attendu

Les résultats de ce travail pourraient avoir des applications significatives dans les domaines agronomiques et écologiques. Ils visent à minimiser les pertes économiques liées à ces pathogènes et à promouvoir la santé des écosystèmes forestiers et adjacents.

Chapitre 3

Matériels et méthodes

3.1 Souches étudiées

3.1.1 *Brenneria salicis* et *Xylella fastidiosa*

Dans ce mémoire, les souches de XF et BS ont été cultivées exclusivement dans un laboratoire de type 2 de quarantaine (L2Q). Les souches utilisées sont :

1. *X. fastidiosa* subsp. *fastidiosa* KLN59.3 exprimant la *green fluorescent protein* (GFP), transformée par Newman et al. (2003).
2. *B. salicis* LMG2698_WT
3. *B. salicis* LMG2698 : : Tn7 mNeon green exprimant la protéine fluorescente mNeon Green transformée par L. Pesenti en 2022.

3.1.2 Endophytes étudiés

Au total, 467 endophytes ont été isolés par L. Pesenti à partir de la sève xylémienne de six espèces de la famille des *Salicaceae* : *P. canescens*, *P. tremula*, *P. nigra*, *S. alba*, *S. caprea* et *S. fragilis*. La première fois, la sève a été étalée au rateau sur toute la boîte puis les colonies présentant un phénotype différents ont été isolées et purifiées en utilisant trois repiquage successif avec la méthode du 4/4. Cette méthode a été réalisée sur quatre milieux de culture distincts pour maximiser la sélectivité : BCYE, LBA, PDA et TSA.

Les colonies isolées ont été stockées à -80 °C dans une solution composée à parts égales de leur propre milieu de culture liquide et de glycérol (50 %). Les codes d'identification des souches mentionnées dans ce mémoire suivent cette nomenclature : *Boîte de rangement_numéro de souche*. Par exemple : 3-6_1, 7-9_65, 11-12_23, etc.

3.1.2.1 Endophytes d'intérêt

Parmi les 467 souches, onze d'entre elles, détaillées dans le tableau 3.1, ont été sélectionnées en raison de leurs propriétés PGP (Promotion de la Croissance des Plantes) et/ou de leurs capacités antagonistes à XF et BS *in vitro*. Pour observer les endophytes *in vitro*, les bactéries sont transformées pour exprimer la protéine fluorescente mCherry excitée à des longueurs d'ondes allant de 540 à 590 nm et émettant dans des longueurs d'ondes de 550 à 650 nm.

Espèce	Souche	Arbre
<i>Bacillus haynesii</i>	8_86	<i>P. nigra</i>
<i>Bacillus pseudomycoïdes</i>	8_70	<i>P. tremula</i>
<i>Bacillus subtilis</i>	9_137	<i>P. tremula</i>
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	7_9	<i>P. tremula</i>
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	3_53	<i>S. fragilis</i>
<i>Bacillus velezensis</i>	8_109	<i>P. canescens</i>
<i>Pseudomonas coleopterorum</i>	8_74	<i>P. tremula</i>
<i>Pseudomonas coleopterorum</i>	8_76	<i>P. tremula</i>
<i>Pseudomonas coleopterorum</i>	9_161	<i>P. canescens</i>
<i>Pseudomonas coleopterorum</i>	9_167	<i>P. canescens</i>
<i>Pseudomonas graminis</i>	9_109	<i>P. canescens</i>

Table 3.1 – Endophytes d'intérêt : espèces, souches correspondantes et espèce de l'arbre dont la souche a été isolée. où les souches surlignées en rouges expriment déjà le gène mCherry

3.1.3 Milieux de culture

Les compositions des différents milieux de culture utilisés dans ce mémoire sont détaillées dans les tableaux 3.4, 3.3, 3.2 et 3.5. Ces milieux ont été employés sous forme liquide ou solide en fonction des expériences. La composition des versions liquides est similaire à celle des versions solides, à l'exception des composés surlignés en bleu (agar), qui ne sont pas inclus dans les milieux liquides.

Les milieux LBA, PDA et TSA sont autoclavés pendant 15 minutes à 121°C après mélange des composés. Ils sont ensuite prêts à l'emploi.

3.1.3.1 Composition des milieux

La préparation du milieu BCYE comporte plusieurs étapes. Les composés sont ajoutés dans l'ordre du tableau 3.5. Le pH de la solution est ajusté à 6,9 après ajout du charbon actif, à l'aide de KOH filtré. La solution est autoclavée pendant 15 minutes

Table 3.2 – Composition de 400 mL de milieu LBA (Bertani, 1951)

Produit	Quantité
Extrait de levure	5 g
Peptone	10 g
NaCl	10 g
Agar	15 g
Eau déminéralisée	400 mL

Table 3.3 – Composition de 400 mL de milieu TSA (Atlas, 2004)

Produit	Quantité
Peptone	15 g
Extrait de soja	5 g
NaCl	5 g
Agar	15 g
Eau déminéralisée	400 mL

Table 3.4 – Composition de 400 mL de milieu PDA

Produit	Quantité
Dextrose	10 g
Extrait de pomme de terre	2 g
Agar	7,5 g
Eau déminéralisée	400 mL

Table 3.5 – Composition de 400 mL de milieu BCYE (Wells et al., 1981)

Produit	Quantité
Eau milliQ	376 mL
Aces buffer	4 g
Extrait de levure	4 g
Charbon actif	0,8 g
KOH filtré (1 M)	~16 mL (pH = 6,9)
Agar	6,8 g
Cystéine (80 mg/mL)	2 mL
Pyrophosphate ferrique (34 mg/mL)	6 mL

à 121 °C après ajout de l'agar. Une fois la solution autoclavée, la cystéine et le pyrophosphate ferrique sont ajoutés.

3.2 Métagénomique

3.2.1 Extraction de sève xylémienne

L'extraction de sève xylémienne est réalisée sur des *Salicaceae* âgées de 3 ans : *P. tremula*, *P. canescens*, *S. alba* et *S. caprea*. L'entièreté de l'arbre est découpée en segments de 1 à 2 centimètres de long dans des conditions stériles. Les segments sont ensuite placés dans des tubes Eppendorf et centrifugés à 6000 RPM pendant une minute. La sève xylémienne est récupérée dans le culot du tube et le segment est jeté. Pour chaque arbre, environ 1 à 2 mL de sève sont récupérés et stockés dans des tubes Eppendorf.

3.2.2 Extraction d'ADN du matériel végétal

3.2.2.1 Extraction de l'ADN bactérien dans les feuilles

Pour l'extraction d'ADN de feuille, l'ADN est extrait de la sève avec du Cetyltriméthylammonium bromide (CTAB). Le CTAB est préparé selon les proportions du tableau 3.6.

Table 3.6 – Composition de 100 mL de CTAB (Lohdi et al., 1994). Les solutions surlignées en rouge sont préalablement autoclavées au minimum 15 minutes à 121°C.

Produit	Quantité
Tris (1M; pH 8)	10 mL
CTAB	2 g
EDTA (0,5M; pH 8)	4 mL
NaCl (5M)	28 mL
PVP-40	1 g
Eau distillée	Compléter à 100 mL

Chaque millilitre de sève est mélangé avec 1 mL de solution CTAB dans des Eppendorf de 2 mL. Ceux-ci sont ensuite chauffés à 65°C pendant 30 minutes, puis centrifugés à 16 000 G pendant 5 minutes. Le surnageant est transféré sous hotte dans un nouvel Eppendorf de 2 mL, auquel est ajouté 1 mL d'un mélange de chloroforme et d'alcool isoamylique (24 :1). Les tubes sont vortexés, puis centrifugés 10 minutes à 16 000 G. Ensuite, 700 µL de la phase supérieure sont transférés dans de nouveaux Eppendorf de 1,5 mL contenant 450 µL d'isopropanol à -20°C. Les tubes sont retournés manuellement deux fois, puis stockés à -20°C pendant 20 minutes avant d'être centrifugés à 16 000 G pendant 20 minutes. Le surnageant est retiré, puis 1 mL d'éthanol à 70 % est ajouté. Les tubes sont centrifugés 10 minutes à 16 000 G. Enfin, les échantillons sont séchés à l'air libre, puis réhydratés avec 30 µL d'eau biomoléculaire ou de Tris-EDTA (TE). La concentration et la pureté de l'ADN récupéré sont mesurées au spectrophotomètre Nanodrop 2000 aux longueurs d'onde suivantes : 230, 260 et 280 nm.

3.2.2.2 Extraction de sève

L'extraction de sève est réalisée avec le kit Promega Genomic DNA.

3.2.3 Amplification PCR des régions V1 jusqu'à V9 du gène ARNr 16S

Les échantillons ayant une concentration supérieure à 20 ng/μL ont été amplifiés par PCR classique. Les séquences d'amorces utilisées ciblent les régions V1 à 29 du gène de l'ARNr 16S, comme indiqué dans le tableau 3.7. La composition du mélange PCR est donnée dans le tableau 3.8.

Table 3.7 – Amorces d'amplification du gène de l'ARNr 16S (Center, 2019).

Séquence sens 27F (5'-3')	Séquence anti-sens 1492R (5'-3')
AGAGTTTGATCATGGCTCA	TACGGTTACCTTGTTACGACTT

Table 3.8 – Composition pour 25 μL d'un mélange PCR. Les lignes surlignées en bleu concernent les produits remplacés si la polymérase utilisée est la MM Phusion

Produit	Quantité
Eau biomoléculaire	14,37 μL
Tampon ADN polymérase Taq	5 μL
MgCl ₂ (10 mM)	2 μL
dNTPs (10 mM)	0,5 μL
Amorce 27F (10 mM)	0,5 μL
Amorce 1492R (10 mM)	0,5 μL
Taq polymérase (10 mM)	0,13 μL
ADN à amplifier	2 μL

Une fois les composants mélangés dans des microtubes, ils sont placés dans un thermocycleur BIORAD et suivent le cycle PCR décrit dans le tableau 3.9. Chaque PCR inclut un contrôle négatif, où l'ajout d'ADN est remplacé par de l'eau biomoléculaire, et un contrôle positif approprié. Généralement, l'ADN de *B. salicis* LMG2698_WT est utilisé comme contrôle positif.

Des essais ont également été réalisés avec une autre polymérase : la MM Phusion dans laquelle sont compris les dNTPs, le tampon et le MgCl₂. L'intérêt de cette polymérase réside notamment dans son taux d'erreur 50 fois inférieur à celui de la Taq polymérase et son extension rapide (15 à 30 s/kb)(International, 2024). Par conséquent, les cycles PCR et Les proportions sont adaptés. Dans ce cas, 9,25 μL d'eau biomoléculaire, 12,5 μL de MM Phusion et 0,625 μL d'amorces 27F et 1492R. D'autres essais ont également été réalisés avec la MM Phusion et des acides nucléiques peptidiques (PNA) chloroplastiques (PNAc) et mitochondriaux (PNAm). Les PNA sont des polymères synthétiques semblable à l'ADN ou à l'ARN mais possédant un squelette peptidique non chargé au lieu d'un glucose-phosphate. Cela leur permet

de se lier spécifiquement à un brin d'ADN en empêchant l'action de la polymérase. L'ajout de ces PNA modifie à nouveau les proportions du mix : 3,75 μ L de PNAc et PNAm, 1,25 μ L d'amorce sens et anti-sens, 6,75 μ L d'eau biomoléculaire et 6,25 μ L de la polymérase MM Phusion. Le cycle adapté est disponible en annexe A.

Table 3.9 – Cycle PCR 16S.

Étapes	Température [°C]	Temps [mm :ss]	Cycles
Dénaturation initiale	95	05 :00	1
Dénaturation	95	01 :00	30
Appariement	61	00 :30	30
Élongation	72	01 :30	30
Élongation finale	72	10 :00	1
Conservation	4	/	/

3.2.3.1 Gel d'électrophorèse

Pour vérifier si l'amplification s'est déroulée correctement, 5 μ L de chaque produit PCR sont déposés dans les puits d'un gel d'électrophorèse (Tris-borate 89 mM, agarose 1,2 %, acide borique 89 mM, EDTA 2 mM, GelRed 0,1 μ g/mL). Des échelles de poids moléculaire sont ajoutées aux extrémités du gel pour évaluer la taille des amplicons. La migration dure environ une heure à une différence de potentiel de 90 à 130 V. Les amplicons sont visualisés grâce à des UV dans un appareil BIORAD (*Molecular Imager®Gel Doc™XR*).

3.3 Protocole de confrontation *in vivo* endophytes-pathogènes

Le test de confrontation *in vivo* consiste en la co-inoculation de BS et XF exprimant la GFP, indépendamment l'une de l'autre, avec chacun des endophytes d'intérêt repris dans le tableau 3.1 préalablement transformés l'exception des souches 3_53, 8_76, 9_161 et 9_167. Les inoculations sont réalisées sur 35 plants de *Nicotiana tabacum* var. Xanthi âgés de deux mois selon le plan décrit dans le tableau 3.10. Les plants sont numérotés de 1 à 35 suivant l'ordre du tableau.

Avant d'être inoculés, une PCR sur chaque plant est réalisée pour établir l'absence de BS et XF. Celle-ci est réalisée en prélevant la feuille de chaque plant. Le pétiole et la nervure principale de la feuille sont découpés puis broyés dans un Eppendorf à l'aide d'un micropillon et 1 mL de CTAB en conditions stériles. Ensuite de l'ADN bactérien est extrait selon le protocole décrit dans la sous-section 3.2.2.1. Finalement, une PCR puis un gel sont réalisés. Des amorces spécifiques à BS et XF sont utilisés

Table 3.10 – Plan expérimental des inoculations sur *N. tabacum* var. Xanthi.

Pathogène	Endophyte	Répétition
<i>Témoin négatif</i>	/	1
<i>Témoin négatif inoculation</i>	/	2
<i>Brenneria salicis</i>	<i>Témoin négatif</i>	2
	<i>Bacillus pseudomycoïdes</i>	2
	<i>Bacillus velezensis</i>	2
	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	2
	<i>Bacillus subtilis</i>	2
	<i>Bacillus haynesii</i>	2
	<i>Pseudomonas graminis</i>	2
	<i>Pseudomonas coleopterorum</i>	2
<i>Xylella fastidiosa</i>	<i>Témoin négatif</i>	2
	<i>Bacillus pseudomycoïdes</i>	2
	<i>Bacillus velezensis</i>	2
	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	2
	<i>Bacillus subtilis</i>	2
	<i>Bacillus haynesii</i>	2
	<i>Pseudomonas graminis</i>	2
	<i>Pseudomonas coleopterorum</i>	2

voir tableau 3.11. Si le gel ne montre pas d'amplification le plant est considéré comme exempt de la bactérie avant inoculation.

Les plants sont inoculés le 23/11/2023 (T0) en serre de quarantaine et y restent durant l'ensemble de l'expérience jusqu'à leur destruction. L'inoculation est réalisée par la méthode d'inoculation "*pinprick*" décrite dans la section 3.3.3. Après 14 (T1) et 21 (T2) jours après l'inoculation, la feuille la plus proche au dessus du point d'inoculation de chaque plant est prélevée. Le 22^{ème} jour (T3), la feuille la plus jeune (la plus haute) est prélevée. Pour chacune des feuilles récoltées, une extraction d'ADN, deux PCR et finalement un gel sont réalisés. La première PCR est réalisée avec les amorces décrites dans le tableau 3.11 pour évaluer la présence ou non du pathogène à ce niveau de la plante. La seconde PCR est réalisée à partir des amorces du tableau 3.12 pour évaluer la présence du pathogène à ce niveau de la plante.

Table 3.11 – Amorces d'amplifications spécifiques à *Brenneria Salicis* et *Xylella fastidiosa* (Minsavage et al., 1994, Hauben et al., 1998).

	Séquence sens 27F (5'-3')	Séquence anti-sens 1492R (5'-3')
BS	CACCATTCGTATCCCGGTG	CTAGCCTGTCAGTTTGAATGCT
XF	GCGTTAATTTTCGAAGTGATTGATTGC	CACCATTCGTATCCCGGTG

Table 3.12 – Séquences des amorces sens communes à toutes les bactéries et anti-sens spécifiques à chaque bactérie.

Amorces	Séquences 5'-3'
Sens Tn7	CACAGCATAACTGGACTGATTTC
Anti-sens B. amyloliquefaciens 7_9	GCGAAGAGTGTGACTGTGGA
Anti-sens B. haynesii 8_86	TCTCATACTACGCAGCGCTG
Anti-sens B. pseudomycoïdes 8_70	CGTTCTCTGCCTGTACTGCA
Anti-sens B. subtilis 9_137	GAAGTAAACCCAGCGCTTGC
Anti-sens B. velezensis 8_70	TCATCCTGCCGGAAGTCAAC
Anti-sens P. coleopterorum 9_167	TACACCATTCCGTTGCAGCT
Anti-sens P. graminis 9_109	TTTCCATGCCCCACATCCTC

3.3.1 Détermination du lien entre la densité optique (DO) et les "colony forming unit" (CFU)

Le lien entre la DO et les CFU a été établi pour documenter la quantité initiale de bactéries inoculées. Cette relation a été déterminée pour les souches 9_137, 8_86, 8_109, 7_9, 9_109 et 9_167. En revanche, le lien DO-CFU n'a pas été réalisé pour la souche 8_70 (*Bacillus velezensis*) en raison de la difficulté à compter les colonies pour cette bactérie.

Le protocole suivi consiste à cultiver chaque bactérie, prélever une oese de la culture bactérienne, et la plonger dans 3 mL de tampon phosphate salin (PBS), dont la composition est détaillée dans le tableau 3.13.

Table 3.13 – Composition de 500 mL de tampon PBS (EPPO (2018)).

Produit	Quantité
NaCl	4 g
KCl	0,1 g
Na ₂ HPO ₄ ·12H ₂ O	1,45 g
KH ₂ PO ₄	0,1 g
Eau déminéralisée	Compléter à 500 mL

Le mélange est vortexé pendant une minute, puis 1 mL de la suspension est transféré dans une cuvette pour spectrophotomètre. La DO est mesurée à 600 nm, d'abord avec le PBS seul comme blanc, puis avec les échantillons. Une deuxième mesure est effectuée après avoir doublé la concentration initiale. Les valeurs de DO pour les deux conditions sont notées.

Les suspensions sont ensuite diluées en série (facteur 1 :10), en transférant 100 µL de la solution précédente dans 900 µL de PBS dans des tubes Eppendorf de 1,5 mL. Les tubes sont vortexés entre chaque dilution. Pour chaque dilution, 100 µL sont

étalés sur milieu LBA dans trois boîtes de Pétri. Les boîtes sont incubées pendant 24 à 48 h à 28 °C. Après incubation, seules les dilutions présentant entre 30 et 300 colonies par réplique sont retenues pour établir la relation entre la DO et les CFU.

3.3.2 Insertion du plasmide Tn7-mCherry chez les *Bacillus*

Le plasmide Tn7-mCherry permet de transformer des bactéries en s'insérant sur le site attTn7 au niveau du gène GlmS des bactéries (DeBoy et Craig, 2000). Il confère l'expression de la protéine fluorescente mCherry, ainsi qu'une résistance à la spectinomycine.

Les *Bacillus* à transformer incluent *Bacillus haynesii* (8_86), *Bacillus pseudomycoïdes* (8_70), *Bacillus subtilis* (9_137), *Bacillus amyloliquefaciens* (7_9), et *Bacillus velezensis* (8_109). Ils ont été transformés le 9 novembre 2023.

Dans un premier temps, le plasmide Tn7-mCherry et le plasmide "helper" sont récupérés depuis les cultures d'*E. coli* contenant ces plasmides. Les plasmides sont purifiés à l'aide du kit *QIAprep Spin Miniprep Kit*, qui suit quatre étapes principales : lyse bactérienne, neutralisation pour précipiter les débris, purification via une colonne, et élution de l'ADN plasmidique.

Les bactéries cibles sont rendues compétentes de manière naturelle. Cela est réalisé en essayant de les récupérer lors de leur phase de croissance exponentielle. Elles sont ainsi cultivées sur milieu LBA, puis incubées pendant 16 h dans 5 mL de LB liquide à 37 °C sous agitation. La DO est mesurée et ajustée à 0,5. Dans des tubes Falcon de 15 mL, 40 µL de plasmides sont ajoutés à 4 mL de solution bactérienne, puis incubés à 37 °C sur roue agitatrice pendant 5 h jusqu'à atteindre une DO de 1,2.

Un volume de 2 mL est transféré dans des tubes Eppendorf de 2 mL, centrifugé à 3300 G pendant 2 minutes. Le surnageant est éliminé et 180 µL de LB ainsi que 20 µL de xylose à 20 % et 1 µL d'ADN plasmidique sont ajoutés. Après incubation à 37 °C pendant 1 h sous agitation, 200 µL du mélange sont étalés sur milieu LBA contenant de l'ampicilline. Les bactéries transformées sont incubées à 28 °C pendant 2 à 3 jours.

3.3.2.1 Vérification

vérification au microscope confocal

Quelques jours après la transformation, la vérification des bactéries transformées a été réalisée au microscope confocal. Une colonie bactérienne est prélevée à l'aide d'une oese et déposée sur une goutte de glycérol sur une lame de microscopie. L'observation

de bactéries rouges se fait en émettant une lumière entre 540-590 nm afin de confirmer ou infirmer l'introduction du plasmide.

Vérification PCR

Plus tard, le 12 février 2024, une vérification a permis de vérifier que la bactérie avait bien été transformée. Comme le plasmide s'insère au niveau du gène GlmS sur le site attTn7 du génome des bactérie. Des amorces spécifiques au plasmide inséré ont été développées (DeBoy et Craig, 2000). Les amorces développées et utilisées sont décrites dans le tableau 3.14 ci-dessous.

Table 3.14 – Amorces spécifiques au plasmide Tn7 mCherry.

Séquence sens(5'-3')	Séquence anti-sens(5'-3')
AGCTCGCCGCGTTGTTTCATCA	AGAACCTTGACCGAACGCAGCG

3.3.3 Inoculation "*Pinprick*"

Le protocole proposé par Almeida et al. (2005) et Hill, Purcell et al. (1995) consiste à mimer l'action des insectes piqueurs-suceurs du xylème pour introduire l'inoculum dans le xylème.

Les bactéries à inoculer sont toutes repiquées en amont sur BCYE pour XF et LBA pour les autres. De la crème bactérienne prélevée avec une oese est mélangée avec 15 mL de tampon succinate-citrate-phosphate (SCP) dont la composition est reprise dans le tableau 3.15.

Table 3.15 – Composition de 400 mL de tampon SCP (EPPO (2018)).

Produit	Quantité
Na ₂ C ₄ H ₄ O ₄	0,67 g
C ₆ H ₅ Na ₃ O ₇	0,46 g
K ₂ HPO ₄	0,6 g
KH ₂ PO ₄	0,4 g
Eau déminéralisée	400 mL

La DO est mesurée et ajustée à 0,3. En se référant aux résultats obtenus dans la sous-section 4.2, cela porte l'ensemble des inocula à des concentrations comprises entre 10⁷ et 10⁸ CFU. Chaque inoculation de pathogène et d'endophyte se fait en serre où 3 gouttes de 10 µL du mélange sont disposées autour de la section de la tige 2 cm au delà du collet. Ensuite, on pique à ce niveau à l'aide d'une seringue 3 fois par goutte. Les plants sont finalement laissés en position horizontale pendant 15 minutes en prenant soin de ne pas arroser les plantes les deux jours précédent l'inoculation.

3.4 Étude milieu-dépendante du microbiote xylémien des *Salicaceae*

3.4.1 Récupération, amplification et purification de l'ADN bactérien

La collection de bactéries isolées depuis la sève xylémienne de saules et peupliers (voir sous-section 3.1.2) est re-cultivée sur le milieu de culture correspondant à celui de leur isolement (BCYE, LBA, PDA, TSA). Les souches sont étalées selon la méthode des quatre quarts. Les bactéries poussent pendant 24 à 48 h à 28 °C.

3.4.1.1 Récupération de l'ADN bactérien

Une fois les bactéries cultivées, une colonie isolée par souche est prélevée à l'aide d'un cure-dent stérile. Chaque colonie est placée dans un microtube Eppendorf contenant 30 µL de tampon TE. Les microtubes sont ensuite placés dans un thermocycleur BIORAD, où la température est portée à 95 °C pendant 10 minutes, suivie d'une phase de refroidissement à 4 °C pendant 5 minutes. Une fois les bactéries lysées, les microtubes sont centrifugés brièvement (10 secondes). La phase liquide contenant l'ADN soluble est prélevée et transférée dans un nouveau microtube.

3.4.1.2 Amplification

Le gène ARNr 16s (région V1 à V9) de chaque ADN extrait est amplifié par PCR selon les étapes décrites dans la sous-section 3.2.3. Une vérification par électrophorèse sur gel est ensuite réalisée, suivant les mêmes procédures que celles présentées dans la sous-section 3.2.3.1. Si l'amplification n'a pas fonctionné, les régions V3-V4 ou V1-V3 sont amplifiées.

3.4.1.3 Purification

Pour chacun des amplicons confirmés par électrophorèse sur gel, une purification est effectuée à l'aide du kit de purification SmartPure de Eurogentec. Après purification, la pureté et la concentration de l'ADN sont mesurées avec un spectromètre Nanodrop 2000. Si la concentration est comprise entre 12 ng/µL et 200 ng/µL, l'amplicon est envoyé pour séquençage selon la méthode Sanger (dans les deux sens de l'ADN) chez Microsynth. Pour les échantillons hors de cette plage de concentration, une reconcentration sous flux laminaire ou une dilution est effectuée pour ajuster les niveaux.

3.4.2 Traitement des données

Une fois les séquences sens et anti-sens reçues aux formats .ab1 et .fasta, elles sont traitées sur Geneious Prime.

3.4.2.1 Nettoyage, alignement des séquences et comparaison

Les séquences antisens sont d'abord inversées en "reverse complement" à l'aide de l'outil correspondant. Ensuite, toutes les séquences sont nettoyées aux extrémités avec l'outil "Trim Ends", en appliquant une probabilité d'erreur de 0,05. Une inspection et un nettoyage manuel complémentaires sont réalisés pour éviter les mauvais alignements. Les séquences sens et antisens de chaque souche sont ensuite alignées par paires, vérifiées, et ajustées manuellement en cas de discordance. L'alignement par paires est réalisé avec "Geneious Alignement" avec les paramètres suivants :

- Alignment type : Global alignment with free end gaps
- Cost Matrix : 65% similarity (5.0-4.0)
- Groupe externe : Archea 45632

Les séquences consensus obtenues sont comparées aux bases de données NCBI via Geneious. avec les paramètres suivants :

- Database : 16S ribosomal RNA
- Program : Blastn
- Result : Hit table
- Maximum hits : 1

avec l'aide de BLAST afin d'identifier le genre ou l'espèce correspondant à chaque souche.

3.4.2.2 Post-traitement des données

Une fois les genres correspondants identifiés pour chaque souche, des arbres phylogénétiques sont générés pour chaque espèce des genres *Salix* et *Populus*. Ces arbres sont construits en alignant les séquences consensus des souches isolées pour chaque espèce. Les séquences sont tronquées pour obtenir une longueur uniforme avant de générer les arbres à l'aide de l'outil "Geneious Tree Builder" avec les paramètres suivants :

- Modèle de distance génétique : Tamura-Nei
- Méthode de construction de l'arbre : Neighbor-joining
- Groupe externe : Archea 45632

Les arbres sont ajustés visuellement à l'aide de l'outil ITOL. Les autres représentations graphiques sont générées avec R.

Chapitre 4

Résultats

4.0.1 Lien entre densité optique (DO) et CFU

Un lien entre la DO et les CFU a été établi pour chaque endophyte étudié. Ce lien peut être décrit par le modèle $y = ax + b$, où :

- x représente la densité optique (DO),
- y correspond au nombre de CFU,
- b est l'ordonnée à l'origine.

La relation est considérée comme linéaire dans un domaine de validité spécifique. En particulier, lorsque le facteur b est différent de 0, la relation ne peut pas être extrapolée à $x = 0$. Dans ce cas, il est recommandé d'utiliser cette équation uniquement pour des valeurs de x (DO) comprises entre 0,3 et 1,4.

Le tableau suivant résume les coefficients a et b obtenus pour chaque souche bactérienne étudiée :

Table 4.1 – Coefficients a et b du modèle $y = ax + b$ pour le lien entre DO et CFU pour chaque souche étudiée.

Souche	a (CFU/DO)	b (CFU)
9_137	$5,5 \times 10^8$	$1,0 \times 10^7$
8_86	$9,3 \times 10^7$	$5,0 \times 10^7$
8_109	$3,34 \times 10^8$	0
7_9	$1,1 \times 10^8$	$9,7 \times 10^7$
9_109	$1,2 \times 10^9$	$-2,6 \times 10^8$
9_167	$4,5 \times 10^8$	$5,0 \times 10^7$

Les résultats montrent des variations significatives dans les coefficients a et b , reflétant des différences potentielles dans les caractéristiques de croissance et de colonisation

des endophytes étudiés. Les droites sont représentées sur la figure en annexe B.

4.1 Transformation des *Bacillus*

Si des colonies pour les différents *Bacillus* utilisés se sont développées sur les milieux sélectifs LBA avec de la spectinomycine et qu'elles semblent fluorescer lors d'une observation au microscope à épifluorescence, l'insertion du plasmide dans le génome n'a pas pu être démontré avec les PCR de détection. Plusieurs hypothèses peuvent être avancée pour expliquer la croissance de colonies sur les milieux : croissance de souches naturellement résistantes mais pas transformées, croissance d'une contamination, trop faible concentration en antibiotique dans les milieux, etc. Nous pouvons également penser que d'autres constituants se trouvaient sur la lame lors de l'observation en microscopie ou qu'un autre autofluorescence a été développée par les colonies sélectionnées.

4.1.1 Vérification PCR

4.2 Confrontation *in vivo* endophytes-pathogènes

4.2.1 Résultat des inoculations

Avant l'inoculation, au T0, tous les plants étaient exempts de *Brenneria salicis* (BS) et *Xylella fastidiosa* (XF), comme illustré dans la figure 2 en annexe.

Pendant toute la durée de l'expérience, aucune différence notable n'a été observée entre les plants témoins négatifs et positifs, à l'exception des plants numéros 23 et 29, qui sont morts suite à l'inoculation par "*pinprick*". Ces derniers présentaient une tige trop endommagée, qui s'est pliée à cet endroit.

Au T1, les prélèvements de feuilles ont été réalisés à une distance moyenne de 1 cm au-dessus du point d'inoculation. Au T2, les prélèvements ont été effectués à une distance moyenne de 3 cm. Les résultats des tests PCR aux temps T1 et T2 sont présentés dans le tableau 4.2 ci-dessous.

Table 4.2 – Résultats des tests PCR effectués sur les plants de tabac inoculés avec différents pathogènes et endophytes.

La colonne **N°** indique le numéro des plants analysés. La colonne **Patho** spécifie les pathogènes inoculés : *BS* correspond à *Brenneria salicis*, *XF* à *Xylella fastidiosa*, *T-* au témoin négatif, et *T- PI* aux témoins ayant subi une inoculation mécanique par "pinprick" sans bactéries. La colonne **Endo** renseigne sur les endophytes inoculés : *B. p.*, *B. v.*, *B. a.*, *B. s.*, *B. h.*, *P. g.* et *P. c.* désignent respectivement *B. pseudomycoides*, *B. velezensis*, *B. amyloliquefaciens*, *B. subtilis*, *B. haynesii*, *P. graminis* et *P. coleopterorum*. Les colonnes **XF T1**, **12** et **BS T1**, **T2** indiquent respectivement les résultats des tests PCR pour détecter XF ou BS, où 1 correspond à une détection positive et 0 à une détection négative. Les colonnes **PCR E T1** et **PCR E T2** concernent les tests PCR réalisés pour détecter les endophytes inoculés, avec la même codification (1 pour une détection positive, 0 pour une négative). Les cellules contenant "/" indiquent que les tests PCR n'ont pas pu être réalisées. Les lignes surlignées en **rouge** mettent en évidence les plants morts. Les lignes surlignées en **bleu** mettent en évidence les plants positifs à XF au T3. Les cases surlignées en **vert** indiquent la confirmation de la présence de l'endophyte ou du pathogène au temps correspondant.

N°	Patho	Endo	XF T1	BS T1	E T1	XF T2	BS T2	E T2
1	T-		0	0	/	0	0	/
2	T- PI		0	0	/	0	0	/
3	T- PI		1	0	/	1	0	/
4	BS	T-	0	1	/	0	1	/
5	BS	T-	0	1	/	0	0	/
6	BS	B. p.	0	1	/	0	1	/
7	BS	B. p.	0	0	/	0	0	/
8	BS	B. v.	0	1	/	0	1	/
9	BS	B. v.	0	1	/	0	0	/
10	BS	B. a.	0	0	/	0	1	/
11	BS	B. a.	0	0	/	0	1	/
12	BS	B. s.	0	0	/	0	0	/
13	BS	B. s.	0	1	/	0	1	/
14	BS	B. h.	0	1	/	0	1	/
15	BS	B. h.	0	1	/	0	1	/
16	BS	P. g.	0	1	0	0	1	1
17	BS	P. g.	0	1	1	0	0	0
18	BS	P. c.	0	1	0	0	0	0
19	BS	P. c.	0	1	1	0	0	0
20	XF	T-	1	0	/	1	0	/
21	XF	T-	1	0	/	1	0	/
22	XF	B. p.	1	0	/	1	0	/
23	XF	B. p.	0	0	/	0	0	/
24	XF	B. v.	0	0	/	0	0	/
25	XF	B. v.	0	0	/	0	0	/
26	XF	B. a.	0	0	/	1	0	/
27	XF	B. a.	1	0	/	1	0	/
28	XF	B. s.	1	0	/	1	0	/
29	XF	B. s.	1	0	/	0	0	/
30	XF	B. h.	1	0	/	1	0	/
31	XF	B. h.	1	0	/	1	0	/
32	XF	P. g.	1	0	1	1	0	0
33	XF	P. g.	1	0	1	1	0	0
34	XF	P. c.	1	0	1	1	0	1
35	XF	P. c.	1	0	1	1	0	1

Au T3, les prélèvements de la dernière feuille ont été réalisés à des hauteurs variables selon la taille des plants. Aucun plant n'a été testé positif à BS ou aux endophytes testés (*P. graminis* et *P. coelestis*). Seule XF a été détectée dans les plants 3, 20, 21, 24 et 34, à une distance moyenne de 28,75 cm au-dessus du point d'inoculation.

Dans l'ensemble des plants témoins et dans deux plants co-inoculés avec *P. graminis* et *B. velezensis*, XF a atteint les feuilles apicales des plants en trois semaines. Ce phénomène suggère un ralentissement de la colonisation verticale de XF en présence des endophytes (exceptés *P. graminis* et *B. velezensis*). Cette interprétation pourrait être appuyée et confirmée par un réisolement des endophytes indétectables par PCR.

Il est difficile de tirer des conclusions solides concernant la colonisation de BS et ses interactions avec les endophytes inoculés.

4.3 Amplification de sève

Les concentrations en ADN de sève purifiée sont relativement faibles et varient entre 1 ng/μL et 10 ng/μL. Les amplifications manquées pourraient donc s'expliquer par des concentrations trop faibles mais pas seulement. En effet, la première PCR 16S effectuée avec la Taq polymérase n'a amplifié aucun ADN. Cela pourrait s'expliquer par une trop faible concentration en ADN bactérien dans la sève. Un essai avec un mélange aux proportions 1 :1 d'ADN bactérien avec de la sève xylémienne brute a aussi été effectué, aucune amplification n'a été observée sur gel (voir figure en annexe). Cela suggère la présence d'inhibiteurs à la Taq polymérase dans la sève xylémienne.

La seconde PCR, effectuée avec la polymérase MM Phusion, n'a pas amplifié l'ensemble des échantillons de sève. Seuls cinq échantillons sont amplifiés, mais à chaque fois deux bandes de tailles différentes sont été observés (voir figure 3 en annexe). Cela suggère que la polymérase MM Phusion est capable d'amplifier les échantillons de sève et qu'il ne s'agit pas exclusivement d'ADN bactérien. Une hypothèse est que des résidus d'ADN mitochondrial et chloroplastique subsistent dans les échantillons de sève. L'utilisation de PNAm et PNAc pourrait confirmer cette hypothèse.

Les échantillons amplifiés lors de la précédente PCR ont donc été réanalysés par PCR avec des amorces PNA. Cette dernière PCR montre également deux amplicons sur gel (voir figure 4.1). Cela suggère que le problème ne résidait pas uniquement

dans des résidus d'ADN mitochondriaux ou chloroplastiques.

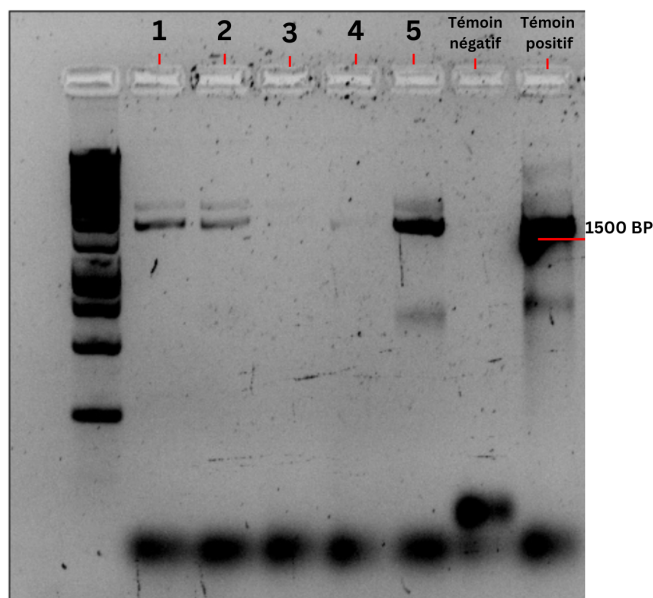


Figure 4.1 – Gel PCR de cinq échantillons de sève amplifiés avec la polymérase MM Phusion, des PNAm et des PNAc. Les amplicons 1, 2 et 5 montrent chacun deux amplifications d'ADN de longueurs différentes de 1500 paires de bases et 2500 paires de bases. L'échelle utilisée à gauche, est le marqueur de poids moléculaire (1 kb, Promega).

4.4 Étude milieu-dépendante du microbiote xylémien de *Salicaceae*

4.4.1 Amplification et caractérisation

Sur les 467 bactéries isolées, 361 ont pu être amplifiées et caractérisées. Ces isolats sont tous répertoriés dans le tableau 3 de l'annexe C. Les régions V1 à V9 ont pu être amplifiées et alignées avec BLAST pour 333 souches, les régions V3-V4 pour 27 souches, et les régions V1-V3 pour une souche unique. Parmi celles-ci, l'identification a pu être menée jusqu'à l'espèce pour 321 souches et jusqu'au genre pour 40 d'entre elles.

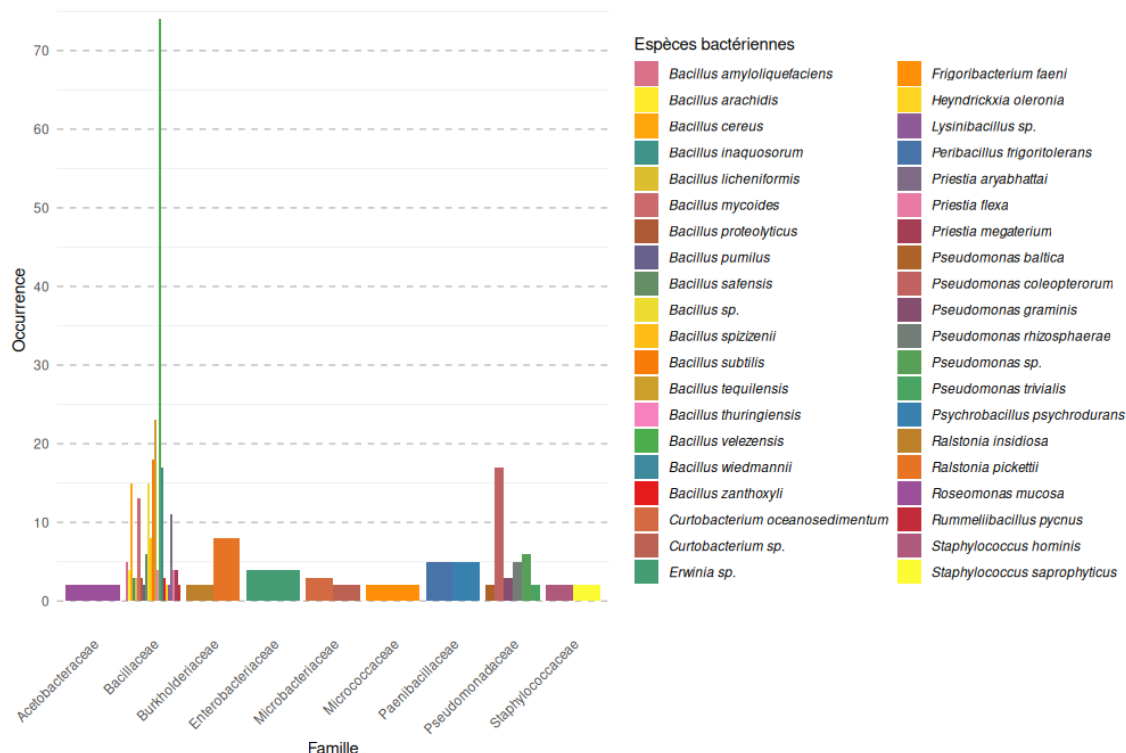


Figure 4.2 – Représentation graphique des espèces bactériennes détectées plusieurs fois avec BLAST par famille bactérienne.

La figure 4.2 met en évidence l'occurrence relative des bactéries identifiées plus d'une fois par rapport à d'autres. Les valeurs précises de la figure 4.2 sont reprises dans le tableau en annexe 2. Cette figure suggère également la présence de clones parmi les bactéries isolées. Cependant, en le recoupant avec le tableau 3 de l'annexe C, il est notable que des souches apparentées à la même espèce ont correspondu à différents numéros d'accension. Par exemple, dans le cas de *Bacillus velezensis*, 12 numéros d'accension distincts sont répertoriés. De plus, pour un même numéro d'accension, le pourcentage d'identité par paires n'est pas toujours constant.

4.4.2 Diversité taxonomique des microbiotes xylémiens

4.4.2.1 Diversité chez les *Salix* et *Populus*

Parmi les souches caractérisées, 185 ont été isolées d'espèces du genre *Salix* et 175 d'espèces du genre *Populus*. Cependant, un nombre significativement plus élevé d'espèces et de genres bactériens différents a été répertorié chez les *Populus* (voir figure 4.3). Dans l'ensemble des *Salicaceae* étudiés, 18 familles bactériennes (*Burkholderiaceae*, *Pseudomonadaceae*, *Xanthomonadaceae*, *Staphylococcaceae*, *Bacillaceae*,

Enterobacteriaceae, *Sphingomonadaceae*, *Microbacteriaceae*, *Acetobacteraceae*, *Micrococcaceae*, *Methylobacteriaceae*, *Nocardiaceae*, *Paenibacillaceae*, *Caulobacteraceae*, *Caryophanaceae*, *Sphingobacteriaceae*, *Nocardiodaceae* et *Streptomycetaceae* appartenant à 4 phyla (Proteobacteria, Firmicutes, Actinobacteria et Bacteroidetes) ont été identifiées. Chez les *Salix*, 41 espèces différentes réparties dans 18 genres ont été identifiées, tandis que chez les *Populus*, 62 espèces appartenant à 25 genres ont été recensées.

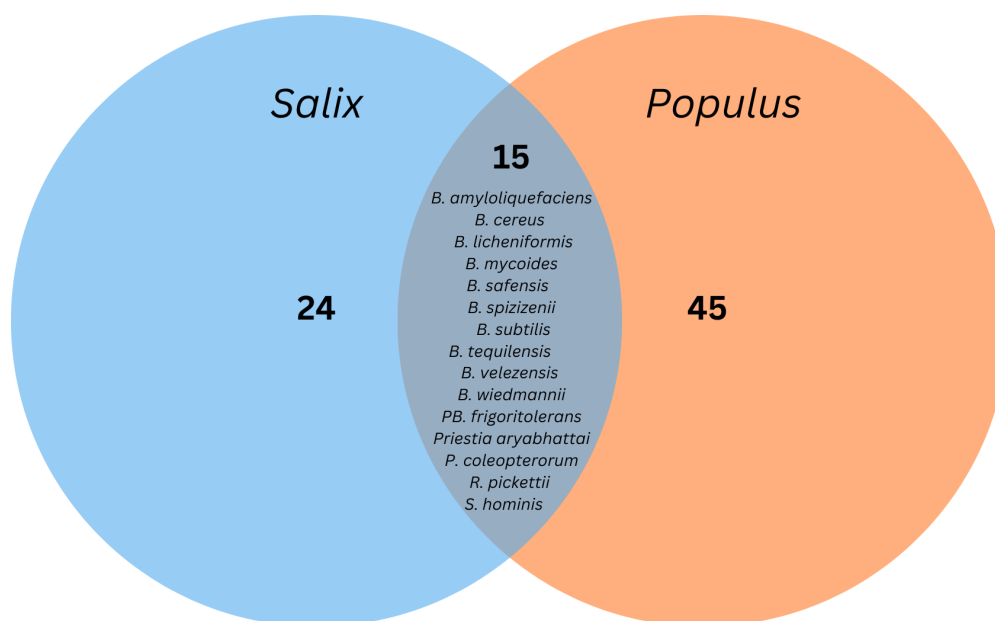


Figure 4.3 – Diagramme de Venn illustrant les espèces bactériennes communes isolées chez *Salix* et *Populus*. Les abréviations sont les suivantes : "**B.**" pour le genre *Bacillus*, "**PB.**" pour le genre *Peribacillus*, "**P.**" pour le genre *Pseudomonas*, "**R.**" pour le genre *Rickettsia*, et "**S.**" pour le genre *Staphylococcus*.

Salix et *Populus* partagent 9 genres bactériens : *Ralstonia*, *Pseudomonas*, *Staphylococcus*, *Bacillus*, *Priestia*, *Lysinibacillus*, *Brevibacillus* et *méthylobacterium*. La figure 4.3 montre que les deux genres partagent une quinzaine d'espèces bactériennes, réparties dans six genres et quatre familles différentes (*Rickettsiaceae*, *Bacillaceae*, *Pseudomonadaceae* et *Staphylococcaceae*). La figure 4.4 met en évidence l'ensemble des familles bactériennes et leur occurrence respective au sein de chaque genre d'arbre.

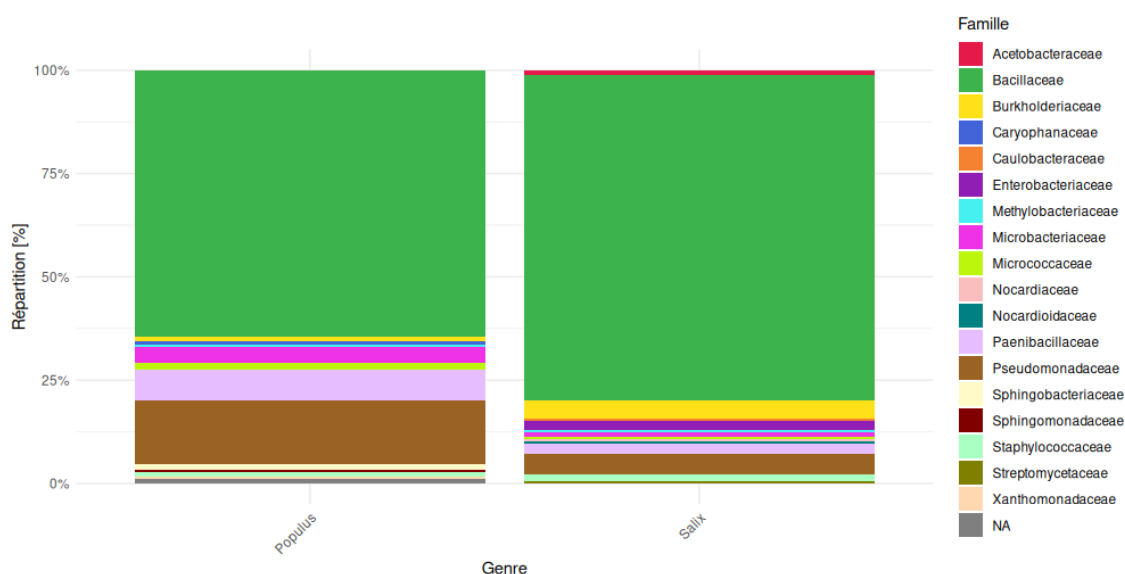


Figure 4.4 – Répartition taxonomique en pourcentage des différentes familles bactériennes isolées chez les genres *Salix* et *Populus*.

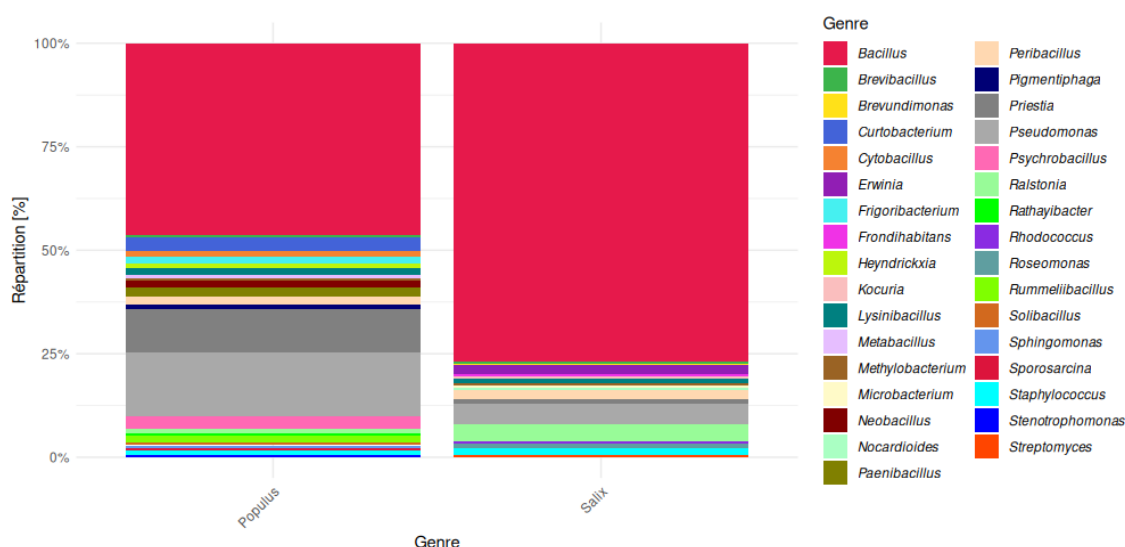


Figure 4.5 – Répartition taxonomique en pourcentage des différents genres bactériens isolés chez les genres *Salix* et *Populus*.

La figure 4.5 met en évidence la diversité des genres bactériens et leur occurrence respective au sein des genres *Salix* et *Populus*.

Les figures 4.4 et 4.5 montrent que les *Populus* présentent une diversité plus importante au niveau des genres bactériens que les *Salix*. Cependant, la niche occupée par le genre *Bacillus* reste dominante dans les deux cas, atteignant plus de 75 % chez les *Salix* et environ 50 % chez les *Populus*.

4.4.2.2 Diversité taxonomique au sein des genres *Salix* et *Populus*

Deux genres sont partagés entre tous les *Salix* : *Pseudomonas* et *Bacillus*. Trois genres sont partagés entre l'ensemble des *Populus* : *Bacillus*, *Neobacillus* et *Priestia*. La figure 4.6 illustre la diversité bactérienne au sein des xylèmes des trois espèces du genre *Salix* étudiées. Seules cinq espèces bactériennes sont communes entre *S. caprea*, *S. alba* et *S. fragilis*.

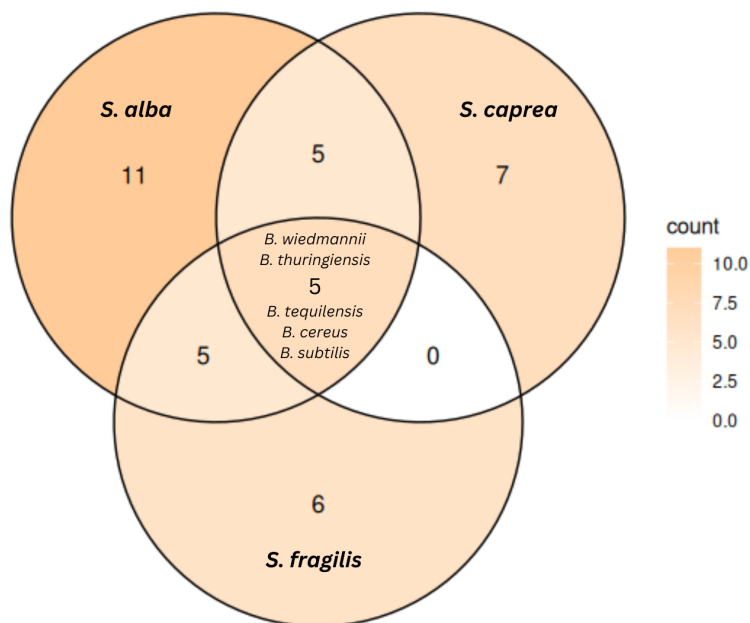


Figure 4.6 – Diagramme de Venn illustrant les espèces bactériennes communes isolées chez *S. caprea*, *S. alba* et *S. fragilis*. L'abréviation "B." désigne le genre *Bacillus*.

De même, la figure 4.7 présente la diversité bactérienne chez trois espèces du genre *Populus*. Deux espèces bactériennes, *B. wiedmannii* et *B. tequilensis*, sont communes à l'ensemble des six espèces arbustives étudiées.

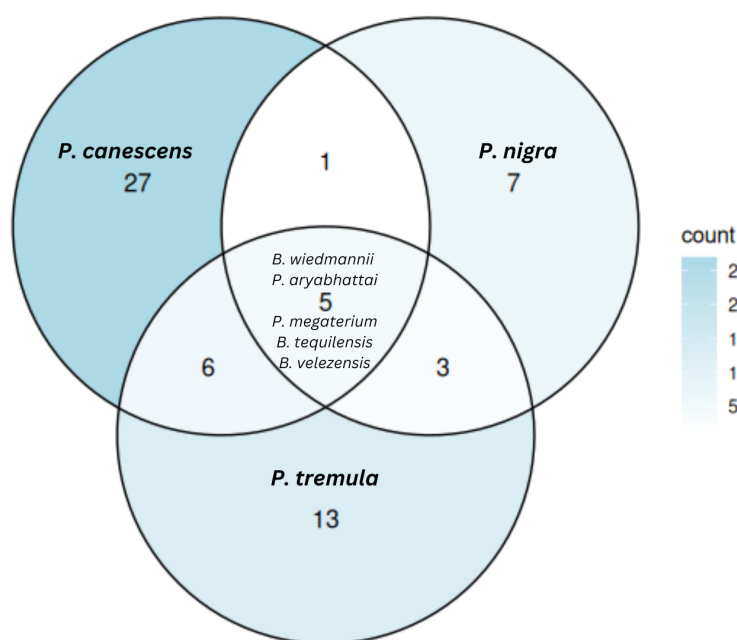


Figure 4.7 – Diagramme de Venn illustrant les espèces bactériennes communes isolées chez *P. canescens*, *P. nigra* et *P. tremula*. Les abréviations "P." et "B." désignent respectivement les genres *Priestia* et *Bacillus*.

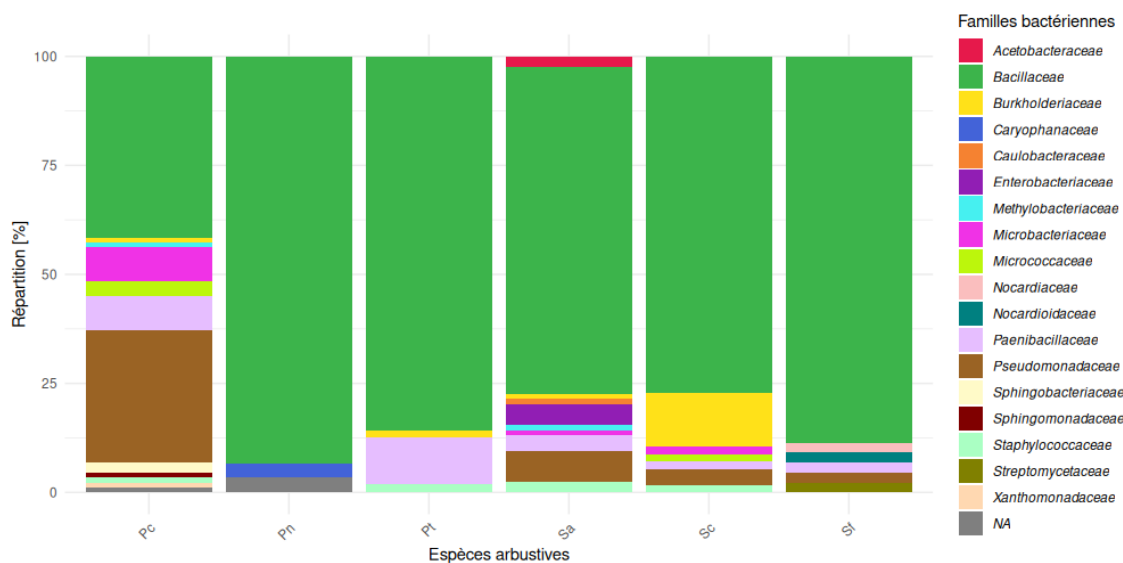


Figure 4.8 – Répartition taxonomique en pourcentage des différentes familles bactériennes au sein des espèces *P. canescens*, *P. nigra*, *P. tremula*, *S. alba*, *S. caprea* et *S. fragilis* (Pc, Pn, Pt, Sa, Sc, Sf).

La figure 4.8 révèle que les niches bactériennes varient considérablement entre les différentes espèces étudiées. Toutefois, la famille des *Bacillaceae* domine en représentant près de 50 % à près de 100 % des espèces isolées selon les arbres.

Chapitre 5

Discussion

Ce mémoire avait pour objectif de mieux comprendre les interactions entre les agents pathogènes XF et BS au sein de *Salix* et *Populus*, en interaction avec les populations endophytes du xylème. Pour ce faire, des endophytes aux propriétés intéressantes ont été transformés, puis co-inoculés *in planta* dans des plants de tabac avec XF ou BS. Ce mémoire visait aussi à explorer le microbiote xylémien de *Salix* et *Populus* par une approche métagénomique à partir de sève xylémienne. Enfin, il cherchait à identifier 467 endophytes précédemment isolés sur différents milieux à partir de la sève xylémienne, afin de caractériser en détail le microbiote xylémien selon une méthode dépendante du milieu de culture.

Les résultats obtenus mettent en lumière le potentiel des endophytes d'intérêt à inhiber la colonisation de XF *in planta*. Ils révèlent également une certaine variabilité du microbiote entre les genres *Salix* et *Populus*, ainsi qu'au sein de ces genres. La discussion de ces résultats permettra d'établir des liens avec la littérature existante et de proposer des perspectives de recherche intéressantes.

Dans un premier temps, la discussion abordera les perspectives d'amélioration du protocole de transformation des *Bacillus*. Ensuite, elle s'intéressera à l'interprétation des résultats liés aux co-inoculations, avant de discuter des perspectives globales. Enfin, elle se focalisera sur la caractérisation des microbiotes de *Salix* et *Populus* et les perspectives qui en découlent.

5.1 Analyse des résultats expérimentaux

5.1.1 Transformation des *Bacillus*

L'échec de la transformation des *Bacillus* décrit dans la section 4.1 du chapitre 4 contraste avec la confirmation de la transformation des bactéries observée au microscope confocal.

Cela peut s'expliquer par un manque de sélectivité des milieux. En effet, il est attendu qu'une partie seulement des bactéries soit transformée, mais un milieu enrichi en spectinomycine devrait empêcher la survie des bactéries non transformées. Or, selon Aslim et al. (2002), de nombreuses souches de *Bacillus* peuvent être résistantes ou partiellement résistantes à la spectinomycine. Une piste d'amélioration du protocole pourrait donc consister à augmenter la concentration en spectinomycine afin d'accroître la sélectivité après transformation. Néanmoins, au-delà d'une certaine concentration renseignées par le fournisseur, même les bactéries transformées ne pourront plus pousser.

La transformation des *Bacillus* avait pour objectif de jouer la compétence naturelle de ceux-ci. Cela en cherchant les récupérer lors de leur phase de croissance exponentielle (où elles sont le plus compétentes) et en utilisant du xylose afin d'augmenter la perméabilité de la membrane (voir le point 3.3.2 du chapitre 3). Néanmoins, les bactéries gram positives comme les *Bacillus* restent plus compliquées à transformer que des bactéries gram négatives (Maier, 2020). Elles sont notamment plus difficiles à rendre compétentes à cause de la structure particulière de leur paroi cellulaire (Huang et al., 2021), qui est plus épaisse et composée de plusieurs couches de peptidoglycanes intégrées dans une matrice d'acide teichoïque. Pour améliorer la compétence des bactéries moins compétentes, des méthodes artificielles ont été développées (Huang et al., 2021). Les méthodes classiques consistent à modifier chimiquement la perméabilité de la membrane, par exemple avec un sel comme le chlorure de calcium, ou à utiliser un champ électrique via l'électroporation. Concernant les bactéries gram-positives, plusieurs approches permettent d'améliorer l'efficacité de l'électroporation :

- Ajout d'éthanol dans le tampon d'électroporation (Assad-García et al., 2008).
- Utilisation de composés tels que la glycine, le lysozyme ou la pénicilline pour amincir ou affaiblir la paroi cellulaire (Thompson et Collins, 1996, Rodríguez et al., 2007).
- Induction d'un stress osmotique à l'aide de NaCl (Palomino et al., 2010).
- Ajustement des paramètres du choc électrique (V/cm, durée, etc.) (Huang

et al., 2021).

- ajustement du temps de croissance et de la concentration des bactéries pour optimiser leur compétence (Huang et al., 2021).

Ces différents paramètres constituent autant de pistes à explorer pour améliorer le protocole de transformation des *Bacillus* d'intérêt. Par exemple, Yi et Kuipers propose une transformation efficace de souches de *B. mycoides* en utilisant de la glycine et de la DL-thréonine pour affaiblir les parois cellulaires, lorsque la DO₆₀₀ atteignait 0,85 en culture liquide.

Ces transformations, bien que constituant un véritable défi, restent un objectif réalisable et nécessaire pour répondre aux objectifs visés dans ce mémoire c'est à dire observer et mieux comprendre les interactions *in vivo* d'endophytes d'intérêts avec BS et XF.

5.1.2 Interactions *in planta* entre endophytes et pathogènes

Le test *in planta* effectué ne permet pas de tirer de grandes conclusions générales en raison de la taille du plan expérimental et de l'impossibilité d'observer les endophytes, ni par microscopie confocale ni par PCR.

Néanmoins, l'essai mené sur des plants de tabac a permis de mettre en évidence la possibilité d'utiliser *N. tabacum* var. Xanthi comme plante modèle pour étudier les interactions de BS avec des endophytes. Bien que, selon Maes et al. (2002), les inoculations artificielles aient un faible taux de réussite, il a été démontré que BS peut être inoculée par la méthode du *pinprick* dans des plants de tabac. Elle y survit au moins deux semaines et colonise la plante en remontant vers le haut, atteignant au moins 3 cm en deux semaines. Ces possibilités n'étaient pas encore documentées dans la littérature. Les résultats montrent que BS ne colonise pas les organes aériens du tabac aussi rapidement que XF, ou à des concentrations inférieures à la limite de détection, soit 40 CFU/mL par extrait de feuille (Hauben et al., 1998).

En ce qui concerne l'inoculation des endophytes, seule l'inoculation de *P. graminis* et *P. coleopterorum* a pu être confirmée par PCR. Cela indique que la méthode du *pinprick* fonctionne pour ces endophytes. La réussite de l'inoculation des autres endophytes n'a pas pu être confirmée par PCR en raison de leur absence de transformation. Il faut donc rester prudent quant aux interprétations faites ci-dessous, qui considèrent que ces inoculations ont tout de même fonctionné.

N. tabacum était déjà connu comme hôte expérimental pour étudier XF (Lopes et al., 2000). Cependant, le test a permis de fournir des pistes encourageantes concernant

les propriétés antagonistes de certaines souches d'endophytes d'intérêt testées. En effet, tous les plants inoculés avec XF seule ont été infectés jusqu'à leur apex en deux semaines, alors que dans les plants co-inoculés avec *B. amyloliquefaciens*, *B. haynesii* et *P. graminis*, XF n'a pas atteint l'apex des plants testés. *B. pseudomycoides* et *B. subtilis* ont également inhibé la colonisation de XF chez les plants ayant survécu à l'inoculation par *pinprick*. Enfin, *P. coleopterorum* a inhibé la colonisation de XF dans un des deux plants co-inoculés avec XF (voir tableau 4.2 de la sous-section 4.2.1).

Les résultats obtenus s'accordent avec les données de la littérature. La plupart des espèces inoculées ont déjà montré des propriétés antagonistes contre XF *in vitro* (Zicca et al., 2020, Chun et al., 2019, Biondi et al., 2021, Zhang et al., 2023). Ces observations permettent également d'élargir les perspectives sur les opportunités qu'offrent ces espèces bactériennes dans des essais *in vivo*.

Bien que récemment, *Bacillus subtilis* ait été classée comme un bon colonisateur *in planta*, hautement antagoniste à XF et médiateur efficace des gènes de défense de la plante (Zicca et al., 2020), peu de documentation existe sur les essais *in vivo* réalisés avec les autres espèces bactériennes étudiées et leurs propriétés antagonistes contre XF ou BS. Pourtant, la communauté scientifique semble s'accorder sur la nécessité d'essais *in planta* pour approfondir la compréhension des interactions entre endophytes, pathogènes et plantes (Zicca et al., 2020, Naik et al., 2021).

En conclusion, ce test s'est révélé pertinent et pourrait être, dans un premier temps, réitéré sur des plants de tabac, tout en s'assurant de confirmer par PCR la transformation des endophytes au préalable. Dans un second temps, la réalisation d'essais *in vivo* sur des saules et peupliers sensibles à XF et BS permettrait d'observer les effets des endophytes d'intérêt sur les symptômes de XF et BS chez les *Salicaceae*. *P. tremula* a été décrite comme une espèce particulièrement sensible à XF par Casarin et al. et pourrait donc être une hôte de choix pour un test *in vivo* d'envergure, aux côtés d'autres espèces sensibles à BS telles que *S. alba* et *S. fragilis* (Maes et al., 2009).

5.1.3 Amplification de sève xylémienne

La réplique de l'ADN présent dans la sève xylémienne n'a pas fonctionné comme souhaité (voir section 4.3). Cette discussion a pour objectif d'explorer les raisons possibles de cet échec et de proposer des pistes de solutions pour atteindre l'objectif

d'amplification d'ADN bactérien provenant de la sève xylémienne de *Salicaceae*.

La non-amplification du mix PCR avec la Taq polymérase ne peut pas s'expliquer par une quantité insuffisante d'ADN dans la sève extraite, malgré des concentrations parfois faibles (autour de 2 ng/ μ L). Cette concentration est généralement suffisante pour permettre l'amplification de ce type d'ADN avec la Taq polymérase (Saiki et al., 1988). Cependant, la sève xylémienne transporte de l'ADN d'origine végétale, fongique et bactérienne, et il est possible que la concentration en ADN bactérien ait été trop faible dans certains cas (Lowe-Power et al., 2018a). Pourtant, cette hypothèse ne semble pas suffisante, car l'utilisation d'une autre polymérase, la MM Phusion, a permis d'amplifier de l'ADN provenant de la sève.

Par ailleurs, de nombreux composés, tels que les polyphénols et les polysaccharides, peuvent inhiber l'activité de la Taq polymérase (Sidstedt et al., 2020 Katcher et Schwartz, 1994). La sève xylémienne de *Salicaceae* a été identifiée comme riche en polyphénols (Autor et al., 2022), ce qui pourrait expliquer l'inhibition observée de la Taq polymérase.

L'utilisation de la MM Phusion a permis l'amplification de l'ADN pour certains échantillons de sève, mais plusieurs tailles différentes d'amplicons ont été observées sur gel (voir figure 4.1 du chapitre 4). Cela indique que le gène de l'ARNr 16S n'est pas le seul à être amplifié. L'ajout de PNAm et PNAc n'a pas permis d'améliorer ces résultats. Pourtant, les séquences des amorces sens et anti-sens ont été alignées sur les génomes des genres *Populus* et *Salix* à l'aide de l'outil BLAST, disponible dans la base de données NCBI. Les résultats montrent que seules des régions codantes des chloroplastes et mitochondries présentent des alignements significatifs avec ces amorces. Une hypothèse est que des molécules présentes dans la sève pourraient complexer avec les PNA, les rendant inefficaces ou provoquant une amplification chromosomique autre que chloroplastique ou mitochondriale.

Pour améliorer le protocole, une première suggestion serait d'utiliser des amorces différentes, ne s'alignant pas avec les régions codantes des chloroplastes ou mitochondries de *Salix* et *Populus*. Une seconde proposition consisterait à reconcentrer l'ADN et à dénaturer les polyphénols avant de réaliser la PCR. Cela pourrait être réalisé en lyophilisant la sève, puis en la réhydratant avec un volume réduit de TE ou d'eau biomoléculaire. En effet, la lyophilisation peut dénaturer les polyphénols présents dans la sève xylémienne de peuplier (Lindroth et Pajutee, 1987). Ce processus consiste à sublimer l'eau présente dans un échantillon en utilisant des conditions extrêmes de

pression et de température (de l'ordre de -40°C et 0,01 mbar).

5.1.4 Caractérisation du microbiote xylémien de *Salix* et *Populus*

À ce jour, aucune étude ne traite spécifiquement du microbiote xylémien des *Salicaceae*. Cependant, plusieurs travaux proposent des informations sur la composition et les variations taxonomiques du microbiote des *Salicaceae* au niveau du sol, des feuilles, de la tige et des racines (Cregger et al., 2018, Cregger et al., 2021, Kandel et al., 2017). Les phyla bactériens répertoriés au niveau de la tige des *Salicaceae* (Proteobacteria, Actinobacteria, Bacteroidetes et Bacillota) dans ces études sont similaires à ceux obtenus de manière culture-dépendante dans le xylème (Cregger et al., 2021, Hacquard et Schadt, 2015). Toutefois, leurs proportions respectives diffèrent.

Dans la littérature, les phyla Proteobacteria, Actinobacteria, Bacteroidetes et Bacillota représentent respectivement 40 à 50%, 15 à 20%, 5 à 10% et 1 à 3% de la diversité de la communauté microbienne des *Salicaceae*. Dans le xylème, les résultats obtenus placent les Bacillota en première position, représentant 65,1%, suivis des Proteobacteria (18,6%), des Actinobacteria (14,0%) et des Bacteroidetes (2,3%). Cette répartition s'explique notamment par la forte présence d'espèces du genre *Bacillus*. Concernant le core microbiote du xylème de *Salix* et *Populus*, une quinzaine d'espèces différentes ont été identifiées, dont 13 appartiennent au phylum des Bacillota et 2 au phylum des Proteobacteria.

Il semble que *P. canescens*, hybride entre *P. tremula* et *P. alba* (Fossati et al., 2004), ait développé une diversité taxonomique microbienne beaucoup plus vaste que celle observée chez ses espèces parentales directes (voir fig. 4.8 et 4.7). Comme énoncé dans la section 1.3.3.2, la majorité des études sur le microbiote xylémien se concentrent sur des espèces arbustives sensibles à XF comme l'olivier, la vigne ou l'amandier (Landa et al., 2022, Anguita-Maeso et al., 2020, Hamaoka et al., 2022). La composition du microbiote xylémien peut considérablement varier au sein d'un genre d'arbres, voire au sein d'une même espèce, en fonction de facteurs tels que l'âge de l'arbre, la saison, le sol, la localisation géographique, etc. (Anguita-Maeso et al., 2020, Cregger et al., 2021, Kandel et al., 2017). L'étude du microbiote xylémien des oliviers menée par Anguita-Maeso et al. souligne que les approches culture-dépendantes et métagénomiques sont complémentaires. Chez les oliviers, la méthode culture-dépendante utilisée semble favoriser la caractérisation des *Actinobacteria* et des *Bacillota* par rapport à une méthode d'approche métagénomique.

En s'intéressant exclusivement au microbiote xylémien des oliviers défini par la méthode culture-dépendante selon Anguita-Maeso et al. (2020), on observe que les

mêmes phyla bactériens sont présents chez les oliviers, les saules et les peupliers, mais dans des proportions différentes. Le genre *Bacillus* est commun au microbiote xylémien des saules, peupliers et oliviers. Concernant la diversité des genres, les genres *Bacillus* (48%), *Pseudomonas* (18%) et *Priestia* (10%) sont les plus représentés chez les peupliers. Chez *Salix*, les genres *Bacillus* (76%), *Pseudomonas* (4%) et *Ralstonia* (3,5%) dominent. Ces répartitions taxonomiques de genre diffèrent sensiblement de celle observée dans le xylème des oliviers, où les trois genres les plus représentés sont *Frigobacterium* (19%), *Methylobacterium* (16%) et *Sphingomonas* (15%) (Anguita-Maeso et al., 2020).

En conclusion, les résultats obtenus concernant le microbiote xylémien de *Salix* et *Populus* mettent en évidence la diversité du microbiote xylémien au niveau des espèces et des genres de la famille des *Salicaceae*. Ces résultats, comparés aux données de la littérature, montrent également que, au sein des tiges des *Salicaceae*, l'occupation microbienne varie considérablement en fonction des différents tissus. L'amplification et la caractérisation du reste des espèces isolées et l'analyse métagénomique de la sève xylémienne seraient pertinentes pour compléter ces observations et approfondir notre compréhension de la diversité microbienne au sein de saules et peupliers sains. Il est également établi que les communautés endophytes peuvent être fortement influencées par d'autres facteurs, tels que l'âge de l'arbre, le type de sol ou les conditions environnementales (Cregger et al., 2021). À terme, caractériser le microbiote xylémien d'arbres plus âgés, soumis à différents types de stress (hydrique, salin, etc.) ou cultivés dans des sols variés, pourrait grandement enrichir notre compréhension du microbiote xylémien des *Salicaceae*. La compréhension de la dynamique du microbiote xylémien des *Salicaceae* ouvre la voie à des approches biotechnologiques innovantes, comme l'utilisation de micro-organismes pour améliorer la tolérance aux pathogènes et aux stress abiotiques.

5.1.4.1 Microbiote et sensibilité à XF et BS

Il est reconnu que la diversité microbienne et son équilibre sont essentiels pour la santé des plantes Yan et al., 2017.

Comme mentionné dans la section 1.3.3.2, une corrélation existe entre la diversité taxonomique et la résistance à XF. De plus, il est indiqué que, dans son expression pathogène, BS perturbe l'équilibre du microbiote xylémien en s'établissant à de hautes concentrations (Campisano et al., 2015). La susceptibilité de *P. tremula*, *S. alba*, *P. canescens* et *S. caprea* à XF, documentée par Casarin et al., 2023, montre que *P. tremula* est très symptomatique, *S. alba* est plutôt asymptomatique, et *S. caprea* présente des similarités avec *S. alba*, bien qu'avec plus de symptômes et une plus grande concentration de XF. Cette étude révèle également que *P. canescens* est

particulièrement résistant à l'inoculation de XF.

Le croisement de ces résultats avec ceux obtenus dans ce mémoire permet de formuler certaines hypothèses et perspectives de recherche. La résistance de *P. canescens* à XF pourrait s'expliquer par la diversité de son microbiote xylémien. De même, le caractère asymptomatique de *S. alba* pourrait être lié aux communautés bactériennes spécifiques présentes dans son xylème. Toutefois, ces hypothèses sont à confirmer car d'autres facteurs, tels que l'architecture du xylème, influencent également la résistance à XF (Chatelet et al., 2011, Navas Cortés, Landa et al., 2024).

En ce qui concerne BS, établir des liens avec la littérature est plus complexe. Bien que *S. alba* soit l'hôte de BS le plus fréquemment enregistré, toutes les espèces de saules étudiées se révèlent sensibles à BS (Pesenti, 2024). L'étude du microbiote xylémien d'espèces identiques de saules symptomatiques et asymptomatiques infectés par BS pourrait aider à identifier les équilibres microbiens permettant de limiter la pathogénicité de BS. Par ailleurs, (De Vos et al., 2007) a montré que l'excès d'azote est associé à la *Watermark disease*. Ainsi, l'étude de l'influence de l'azote sur le microbiote xylémien des saules et des peupliers pourrait fournir de nouvelles pistes pour comprendre cette maladie.

De manière générale, la lutte contre les pathogènes repose souvent sur l'utilisation d'un ou plusieurs agents de biocontrôle indépendants. Cependant, d'un point de vue écologique, les maladies font partie d'un agro-écosystème complexe. En conséquence, une tendance récente consiste à développer des agents de biocontrôle à partir de consortia microbiens, plutôt que d'utiliser des bactéries isolées, afin d'obtenir des résultats plus performants et durables (Meshram et al., 2022). Les microbiotes xylémiens caractérisés dans ce mémoire ouvrent ainsi la perspective de développer et de tester des consortia microbiens efficaces, notamment à partir d'arbres résistants à XF, comme *P. canescens*.

En conclusion, bien que les hypothèses formulées dans cette section soient à confirmer, la caractérisation des microbiotes xylémiens de saules et de peupliers obtenue dans ce mémoire ouvre de nombreuses perspectives pour la lutte contre XF et BS.

Chapitre 6

Conclusion

Ce mémoire a permis d'avancer dans la compréhension et l'élaboration de protocoles afin d'étudier les interactions entre les pathogènes du xylème XF et BS, ainsi que les communautés microbiennes xylémiennes associées aux genres *Salix* et *Populus*. Les résultats obtenus soulignent le potentiel des endophytes sélectionnés à inhiber la progression de ces pathogènes, tout en révélant une grande variabilité dans la composition du microbiote xylémien de *P. canescens*, *P. tremula*, *P. nigra*, *S. alba*, *S. caprea* et *S. fragilis*.

L'analyse des résultats expérimentaux a mis en lumière certaines limitations techniques, notamment dans la transformation des souches de *Bacillus*, qui nécessitent des améliorations protocolaires pour augmenter la sélectivité et l'efficacité des manipulations génétiques. Ces ajustements pourraient ouvrir la voie à des tests *in vivo* d'envergure afin de mieux saisir les interactions entre ces endophytes et XF ou BS au sein des saules et peupliers. D'autres limitations techniques concernant l'analyse métagénomique de la sève de *Salix* et *Populus* ont été identifiées. Des pistes d'amélioration visant à rendre exploitables les échantillons de sève ont été proposées.

Les confrontations *in vivo* ont confirmé la capacité des endophytes sélectionnés à réduire la colonisation de XF dans des plants de *N. tabacum* var. Xanthi en serre. Cependant, le plan expérimental n'ayant pas fonctionné parfaitement, ces tendances pourraient être confirmées par des essais avec l'ensemble des endophytes transformés. Les confrontations *in vivo* ont également mis en évidence la possibilité d'inoculer BS à *N. tabacum* par la méthode *Pinprick*, permettant d'utiliser cette plante comme modèle pour étudier les interactions entre BS et des endophytes.

La diversité taxonomique du microbiote xylémien observée au sein et entre les genres *Salix* et *Populus* a pu être caractérisée de manière culture-dépendante. Les

résultats, confrontés à la littérature, montrent des différences significatives avec le microbiote xylémien de l'olivier. Ils mettent également en évidence que, dans la tige des *Salicaceae*, le microbiote varie fortement en fonction des différents tissus de la plante. Ces observations, peuvent servir de piste afin d'identifier des consortia d'endophytes et approfondir leur rôle dans la résistance aux pathogènes. Étoffer ces résultats par une approche métagénomique et en s'intéressant à des arbres plus âgés, poussant sur des sols différents ou soumis à divers stress, contribuerait à mieux comprendre l'équilibre du microbiote xylémien des *Salicaceae*.

En conclusion, ce travail permet d'envisager des pistes d'améliorations des expériences réalisées et d'orienter des expériences futures. Il ouvre des perspectives prometteuses concernant la compréhension du microbiote xylémien de *Salix* et *Populus* et l'utilisation d'endophytes comme agents de biocontrôle contre des pathogènes majeurs du xylème. Il souligne également l'importance de développer des approches intégratives combinant génomique, écologie microbienne et expérimentation appliquée pour répondre aux défis posés par ces agents pathogènes dans les systèmes agricoles et naturels. Les recherches futures devraient s'orienter vers des études en conditions réelles et sur le long terme, afin de poursuivre les efforts pour lutter contre les pathogènes du xylème de manière durable et efficace.

Bibliographie

- Adeolu, Mobolaji, Seema Alnajjar, Sohail Naushad et Radhey S. Gupta (2016). « Genome-based phylogeny and taxonomy of the ‘Enterobacteriales’ : proposal for Enterobacterales ord. nov. divided into the families Enterobacteriaceae, Erwiniaceae fam. nov., Pectobacteriaceae fam. nov., Yersiniaceae fam. nov., Hafniaceae fam. nov., Morganellaceae fam. nov., and Budviciaceae fam. nov. » In : *International journal of systematic and evolutionary microbiology* 66.12, p. 5575-5599.
- Almeida, Rodrigo PP, Matthew J Blua, João RS Lopes et Alexander H Purcell (2005). « Vector transmission of *Xylella fastidiosa* : applying fundamental knowledge to generate disease management strategies ». In : *Annals of the Entomological Society of America* 98.6, p. 775-786.
- Andrei, Marina, Amalia Ștefaniu, Nicoleta Ene, Lucia Pintilie, Nicoleta Radu, Andrei Justinian Tomescu et Anca Daniela Raiciu (2024). « Multiple natural approaches of *Salix alba*. » In : *Archives of Microbiology and Immunology.*, p. 410-427.
- Anguita-Maeso, Manuel, Concepción Olivares-García, Carmen Haro, Juan Imperial, Juan A Navas-Cortés et Blanca B Landa (2020). « Culture-dependent and culture-independent characterization of the olive xylem microbiota : effect of sap extraction methods ». In : *Frontiers in plant science* 10, p. 1708.
- Aslim, Belma, Necdet Sağlam et Yavuz Beyatli (2002). « Determination of some properties of *Bacillus* isolated from soil ». In : *Turkish Journal of Biology* 26.1, p. 41-48.
- Assad-García, Juan-Simon, Maryse Bonnin-Jusserand, Dominique Garmyn, Jean Guzzo, Hervé Alexandre et Cosette Grandvalet (2008). « An improved protocol for electroporation of *Oenococcus oeni* ATCC BAA-1163 using ethanol as immediate membrane fluidizing agent ». In : *Letters in applied microbiology* 47.4, p. 333-338.
- Atlas, Ronald M (2004). *Handbook of microbiological media*. CRC press.
- Autor, Elsa, Alfonso Cornejo, Fernando Bimbela, Maitane Maisterra, Luis M Gandía et Víctor Martínez-Merino (2022). « Extraction of phenolic compounds from *Populus Salicaceae* bark ». In : *Biomolecules* 12.4, p. 539.
- Bakhshi, Meysam, John Mackay, Mogens Nicolaisen et Masoud Shams-Bakhsh (2021). « Comparative Genomics, Pangenome, and Phylogenomic Analyses of *Brenneria*

- spp., and Delineation of *Brenneria izadpanahii* sp. nov. » In : *Phytopathology*® 111.1. PMID : 32407252, p. 78-95. doi : 10.1094/PHYTO-04-20-0129-FI. eprint : <https://doi.org/10.1094/PHYTO-04-20-0129-FI>. url : <https://doi.org/10.1094/PHYTO-04-20-0129-FI>.
- Bertani, Giuseppe (1951). « Studies on lysogenesis I : the mode of phage liberation by lysogenic *Escherichia coli* ». In : *Journal of bacteriology* 62.3, p. 293-300.
- Biondi, Enrico, Lorenzo Gallipoli, Angelo Mazzaglia, Set Perez Fuentealba, Nemanja Kuzmanović, Assunta Bertaccini et Giorgio Balestra (2021). « *Bacillus*-based products for management of kiwifruit bacterial canker ». In : *Phytopathologia Mediterranea* 60.2, p. 215-228.
- CABI (2022a). « *Brenneria salicis* (watermark) ». In : *CABI Compendium*. doi : 10.1079/cabicompendium.21936. url : <https://doi.org/10.1079/cabicompendium.21936>.
- (2022b). « *Xylella fastidiosa* ». In : *CABI Compendium*. doi : 10.1079/cabicompendium.57195. url : <https://doi.org/10.1079/cabicompendium.57195>.
- Campisano, Andrea, Michael Pancher, Gerardo Puopolo, Antonio Puddu, Sebastià López-Fernández, Barbara Biagini, Sohail Yousaf et Ilaria Pertot (2015). « Diversity in Endophyte Populations Reveals Functional and Taxonomic Diversity between Wild and Domesticated Grapevines ». In : *American Journal of Enology and Viticulture* 66.1, p. 12-21. issn : 0002-9254. doi : 10.5344/ajev.2014.14046. eprint : <https://www.ajevonline.org/content/66/1/12.full.pdf>. url : <https://www.ajevonline.org/content/66/1/12>.
- Casarin, Noemi, Séverine Hasbroucq, Lena Pesenti, Amandine Gérardin, Amélie Emond, Júlia López-Mercadal, Miguel Ángel Miranda, Jean-Claude Grégoire et Claude Bragard (2023). « Salicaceae as potential host plants of *Xylella fastidiosa* in European temperate regions ». In : *European Journal of Plant Pathology* 165.3, p. 489-507.
- Catalogue of Life (2023). *Salicaceae* Mirb. Catalogue of Life. url : <https://www.catalogueoflife.org/data/taxon/FWG>.
- Center, EZBioCloud Help (2019). *16S rRNA and 16S rRNA Gene*. Accessed : 2024-12-27. url : <https://help.ezbiocloud.net/16s-rrna-and-16s-rrna-gene/>.
- Cervantes, Kimberly, Angelyn E Hilton, Rio A Stamler, Richard J Heerema, Clive Bock, Xinwang Wang, Young-Ki Jo, LJ Grauke et Jennifer J Randall (2022). « Evidence for seed transmission of *Xylella fastidiosa* in Pecan (*Carya illinoensis*) ». In : *Frontiers in Plant Science* 13, p. 780335.
- Chatelet, David S., Christina M. Wistrom, Alexander H. Purcell, Thomas L. Rost et Mark A. Matthews (mai 2011). « Xylem structure of four grape varieties and 12 alternative hosts to the xylem-limited bacterium *Xylella fastidiosa* ». In : *Annals of*

- Botany* 108.1, p. 73-85. issn : 0305-7364. doi : 10.1093/aob/mcr106. eprint : <https://academic.oup.com/aob/article-pdf/108/1/73/17002767/mcr106.pdf>. url : <https://doi.org/10.1093/aob/mcr106>.
- Chatterjee, Subhadeep, Rodrigo P P Almeida et Steven Lindow (2008). « Living in two worlds : the plant and insect lifestyles of *Xylella fastidiosa* ». In : *Annu. Rev. Phytopathol.* 46.1, p. 243-271.
- Chun, Byung Hee, Kyung Hyun Kim, Sang Eun Jeong et Che Ok Jeon (2019). « Genomic and metabolic features of the *Bacillus amyloliquefaciens* group–*B. amyloliquefaciens*, *B. velezensis*, and *B. siamensis*–revealed by pan-genome analysis ». In : *Food microbiology* 77, p. 146-157.
- Cornara, Daniele, Marina Morente, Anna Markheiser, Nicola Bodino, Chi-Wei Tsai, Alberto Fereres, Richard A Redak, Thomas M Perring et Joao Roberto Spotti Lopes (2019). « An overview on the worldwide vectors of *Xylella fastidiosa*. » In : *Entomologia Generalis* 39.
- Cregger, MA, AM Veach, ZK Yang, MJ Crouch, R Vilgalys, GA Tuskan et CW Schadt (2018). « The *Populus* holobiont : dissecting the effects of plant niches and genotype on the microbiome ». In : *Microbiome* 6, p. 1-14.
- Cregger, Melissa A., Dana L. Carper, Stephan Christel, Mitchel J. Doktycz, Jessy Labbé, Joshua K. Michener, Nicholas C. Dove, Eric R. Johnston, Jessica A. M. Moore, Jessica M. Vélez, Jennifer Morrell-Falvey, Wellington Muchero, Dale A. Pelletier, Scott Retterer, Timothy J. Tschaplinski, Gerald A. Tuskan, David J. Weston et Christopher W. Schadt (2021). « Plant–Microbe Interactions : From Genes to Ecosystems Using *Populus* as a Model System ». In : *Phytobiomes Journal* 5.1, p. 29-38. doi : 10.1094/PBIOMES-01-20-0009-FI. eprint : <https://doi.org/10.1094/PBIOMES-01-20-0009-FI>. url : <https://doi.org/10.1094/PBIOMES-01-20-0009-FI>.
- Cruz, Luisa F, Paul A Cobine et Leonardo De La Fuente (2012). « Calcium increases *Xylella fastidiosa* surface attachment, biofilm formation, and twitching motility ». In : *Applied and environmental microbiology* 78.5, p. 1321-1331.
- De La Fuente, Leonardo, Marcus V Merfa, Paul A Cobine et Jeffrey J Coleman (2022). « Pathogen adaptation to the xylem environment ». In : *Annual Review of Phytopathology* 60, p. 163-186.
- De La Fuente, Leonardo, Emilie Montanes, Yizhi Meng, Yaxin Li, Thomas J. Burr, H. C. Hoch et Mingming Wu (2007). « Assessing Adhesion Forces of Type I and Type IV Pili of *Xylella fastidiosa* Bacteria by Use of a Microfluidic Flow Chamber ». In : *Applied and Environmental Microbiology* 73.8, p. 2690-2696. doi : 10.1128/AEM.02649-06. eprint : <https://journals.asm.org/doi/pdf/10.1128/AEM.02649-06>.

- 1128/aem.02649-06. url : <https://journals.asm.org/doi/abs/10.1128/aem.02649-06>.
- De Vos, Bruno, Hanneke Huvenne, Eric Messens et Martine Maes (2007). « Nutritional imbalance caused by nitrogen excess is correlated with the occurrence of watermark disease in white willow ». In : *Plant and Soil* 301, p. 215-232.
- DeBoy, Robert et Nancy Craig (juin 2000). « Target Site Selection by Tn7 : attTn7 Transcription and Target Activity ». In : *Journal of bacteriology* 182, p. 3310-3. doi : 10.1128/JB.182.11.3310-3313.2000.
- Dowson, WJ (1937). « Bacterium salicis Day, the cause of the watermark disease of the cricket-bat willow ». In : *Annals of applied Biology* 24.3, p. 528-544.
- Eckenwalder, JE, RF Stettler, HD Bradshaw, PE Heilman et TM Hinckley (1996). « Biology of Populus and its implications for management and conservation ». In.
- EFSA (2023). *Xylella fastidiosa*. Accessed : 2024-12-14. url : https://food.ec.europa.eu/plants/plant-health-and912\%20biosecurity/legislation/control-measures/xylella-fastidiosa_en.
- EFSA (2024). *Xylella fastidiosa - Control measures*. Consulted : 2024-12-15. url : https://food.ec.europa.eu/plants/plant-health-and-biosecurity/legislation/control-measures/xylella-fastidiosa-fr_en.
- EFSA, Claude Bragard, Katharina Dehnen-Schmutz, Francesco Di Serio, Paolo Gonthier, Marie-Agnès Jacques, Josep Anton Jaques Miret, Annemarie Fejer Justesen, Alan MacLeod, Christer Sven Magnusson et al. (2019). « Update of the Scientific Opinion on the risks to plant health posed by Xylella fastidiosa in the EU territory ». In : *EFSA Journal* 17.5, e05665.
- EFSA, Michael, David Caffier, Thierry Candresse, Elisavet Chatzivassiliou, Katharina Dehnen-Schmutz, Gianni Gilioli, Jean-Claude Grégoire, Josep Anton Jaques Miret, Alan MacLeod, Maria Navajas Navarro, Björn Niere, Stephen Parnell, Roel Potting, Trond Rafoss, Vittorio Rossi, Gregor Urek, Ariena Van Bruggen, Wopke Van der Werf, Jonathan West, Stephan Winter, Rodrigo Almeida, Domenico Bosco, Marie-Agnès Jacques, Blanca Landa, Alexander Purcell, Maria Saponari, Ewelina Czwieniczek, Alice Delbianco, Giuseppe Stancanelli et Claude Bragard (2018). « Updated pest categorisation of Xylella fastidiosa ». In : *EFSA Journal* 16.7, e05357. doi : <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2018.5357>. eprint : <https://efsa.onlinelibrary.wiley.com/doi/pdf/10.2903/j.efsa.2018.5357>. url : <https://efsa.onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.2903/j.efsa.2018.5357>.
- EFSA, Vincenzo, Elisa Fasanelli, Davide Gibin, Alicia Gutierrez Linares, Pierfederico La Notte, Luca Pasinato et Alice Delbianco (2024). « Update of the Xylella spp.

- host plant database-Systematic literature search up to 31 December 2023 ». In : *EFSA Journal* 22.7, e8898.
- EPPO (2018). « PM 7/24-3 *Xylella fastidiosa* ». In : *Bulletin OEPP. EPPO Bulletin* 48, p. 175-218. doi : 10.1111/epp.12469. url : <https://doi.org/10.1111/epp.12469>.
- EPPO (2024). *XYLEFA - EPPO Links*. Consulted : 2024-12-15. url : <https://gd.eppo.int/taxon/XYLEFA/eppolinks>.
- Esmaeel, Qassim, Lidianie Miotto, Marine Rondeau, Valérie Leclère, Christophe Clément, Cédric Jacquard, Lisa Sanchez et Essaid A Barka (2018). « Paraburkholderia phytofirmans PsJN-plants interaction : from perception to the induced mechanisms ». In : *Frontiers in Microbiology* 9, p. 2093.
- Fadeev, Egor, Marina G. Cardozo-Mino, Jennifer Z. Rapp, Christina Bienhold, Ian Salter, Vanesa Salman-Carvalho, Marcello Molari, Halina E. Tegetmeyer, Pier Luigi Buttigieg et Antje Boetius (2021). « Comparison of Two 16S rRNA Primers (V3-V4 and V4-V5) for Studies of Arctic Microbial Communities ». In : *Frontiers in Microbiology* 12, p. 637526. doi : 10.3389/fmicb.2021.637526. url : <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.637526>.
- Fatima, Eeman, Muhammad Ammar Javed, Aqsa Hafeez et Baber Ali (avr. 2024). « The Beneficial Plant Microbial Association for Sustainable Agriculture ». In : isbn : 9781774917640. doi : 10.1201/9781003501893-11.
- Fisher, Mary Jones (1928). « The Morphology and Anatomy of the Flowers of the Salicaceae I ». In : *American Journal of Botany* 15.5, p. 307-326. issn : 00029122, 15372197. url : <http://www.jstor.org/stable/2435733> (visité le 26/11/2023).
- Fossati, T, G Patrignani, I Zapelli, M Sabatti, F Sala et Stefano Castiglione (2004). « Development of molecular markers to assess the level of introgression of *Populus tremula* into *P. alba* natural populations ». In : *Plant Breeding* 123.4, p. 382-385.
- G. Forst (2023). *Xylosma*. Plants of the world worldwide. url : <https://powo.science.kew.org/taxon/urn:lsid:ipni.org:names:332071-2/general-information>.
- Gilbert, Gregory S. et Ingrid M. Parker (2016). « The Evolutionary Ecology of Plant Disease : A Phylogenetic Perspective ». In : *Annual Review of Phytopathology* 54. Volume 54, 2016, p. 549-578. issn : 1545-2107. doi : <https://doi.org/10.1146/annurev-phyto-102313-045959>. url : <https://www.annualreviews.org/content/journals/10.1146/annurev-phyto-102313-045959>.
- GIM, ELI, Gembloux agro biotech, SPW et Forêt.nature (2019). *Fiche essence*. <https://www.fichierecologique.be/#!/>. Consulté le 5 décembre 2024.
- Gluck-Thaler, Emile, Aude Cerutti, Alvaro L Perez-Quintero, Jules Butchacas, Verónica Roman-Reyna, Vishnu Narayanan Madhavan, Deepak Shantharaj, Marcus V

- Merfa, Céline Pesce, Alain Jauneau et al. (2020). « Repeated gain and loss of a single gene modulates the evolution of vascular plant pathogen lifestyles ». In : *Science advances* 6.46, eabc4516.
- Hacquard, Stéphane et Christopher W Schadt (2015). « Towards a holistic understanding of the beneficial interactions across the Populus microbiome ». In : *New Phytologist* 205.4, p. 1424-1430.
- Hamaoka, Kazuhiro, Yoshinao Aoki, Sayuri Takahashi, Shinichi Enoki, Kosuke Yamamoto, Keisuke Tanaka et Shunji Suzuki (2022). « Diversity of endophytic bacterial microbiota in grapevine shoot xylems varies depending on wine grape-growing region, cultivar, and shoot growth stage ». In : *Scientific Reports* 12.1, p. 15772.
- Hanneke, Huvenne, Messens Eric et Maes Martine (2009). « Willow wood sap promotes the density-dependent pathogenesis of *Brenneria salicis* ». In : *Environmental Microbiology* 11.6, p. 1463-1472.
- Hauben, Lysiane, Muriel Steenackers et Jean Swings (1998). « PCR-based detection of the causal agent of watermark disease in willows (*Salix* spp.) » In : *Applied and Environmental Microbiology* 64.10, p. 3966-3971.
- Hill, BL, AH Purcell et al. (1995). « Acquisition and retention of *Xylella fastidiosa* by an efficient vector, *Graphocephala atropunctata* ». In : *Phytopathology* 85.2, p. 209-212.
- Huang, Hui, Zubi Liu, Yiyang Qiu, Xuejun Wang, Haixia Wang, Hailong Xiao et Zhenmei Lu (mai 2021). « Efficient electrotransformation of *Rhodococcus ruber* YYL with abundant extracellular polymeric substances via a cell wall-weakening strategy ». In : *FEMS Microbiology Letters* 368.9, fnab049. issn : 0378-1097. doi : 10.1093/femsle/fnab049. eprint : <https://academic.oup.com/femsle/article-pdf/368/9/fnab049/37952172/fnab049.pdf>. url : <https://doi.org/10.1093/femsle/fnab049>.
- Hugouvieux-Cotte-Pattat, Nicole, Jean-Pierre Flandrois, Jérôme Briolay, Sylvie Reverchon et Céline Brochier-Armanet (2024). « Description of a new genus of the Pectobacteriaceae family isolated from water in coastal brackish wetlands of the French Camargue region, *Prodigiosinella* gen. nov., including the new species *Prodigiosinella aquatilis* sp. nov. ». In : *Systematic and Applied Microbiology* 47.2, p. 126497. issn : 0723-2020. doi : <https://doi.org/10.1016/j.syapm.2024.126497>. url : <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0723202024000110>.
- Huvenne, Hanneke, Eric Messens et Martine Maes (2009). « Willow wood sap promotes the density-dependent pathogenesis of *Brenneria salicis* ». In : *Environmental Microbiology* 11.6, p. 1463-1472.

- Ingel, Brian, Denise Caldwell, Fiona Duong, Dilworth Y Parkinson, Katherine A McCulloh, Anjali S Iyer-Pascuzzi, Andrew J McElrone et Tiffany M Lowe-Power (2022). « Revisiting the source of wilt symptoms : X-ray microcomputed tomography provides direct evidence that *Ralstonia* biomass clogs xylem vessels ». In : *PhytoFrontiers*TM 2.1, p. 41-51.
- International, VWR (2024). *Page produit sur le site VWR*. Accessed : 2024-12-27. url : <https://be.vwr.com/store/product/fr/9091913/null>.
- Isebrands et J. Richardson (2014). « Poplars and willows Trees for Society and the Environment. » In : *CABI*, 577–602. doi : 10.1079/9781780641089.0577. url : <https://doi.org/10.1079/9781780641089.0577>.
- Kandel, Shyam L, Andrea Firrincieli, Pierre M Joubert, Patricia A Okubara, Natalie D Leston, Kendra M McGeorge, Giuseppe S Mugnozza, Antoine Harfouche, Soo-Hyung Kim et Sharon L Doty (2017). « An in vitro study of bio-control and plant growth promotion potential of Salicaceae endophytes ». In : *Frontiers in Microbiology* 8, p. 386.
- Katcher, HL et I Schwartz (1994). « A distinctive property of Tth DNA polymerase : enzymatic amplification in the presence of phenol. » In : *Biotechniques* 16.1, p. 84-92.
- Landa, Blanca B., Maria Saponari, Oseias R. Feitosa-Junior, Annalisa Giampetruzzi, Filipe J. D. Vieira, Eliana Mor et Silke Robatzek (2022). « *Xylella fastidiosa*'s relationships : the bacterium, the host plants, and the plant microbiome ». In : *New Phytologist* 234.5, p. 1598-1605. doi : <https://doi.org/10.1111/nph.18089>. eprint : <https://nph.onlinelibrary.wiley.com/doi/pdf/10.1111/nph.18089>. url : <https://nph.onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/nph.18089>.
- Lengrand, S et Bragard Claude Legrève anne Pesenti L (2024). « Bacterial endophytome sources, profile and dynamics—a conceptual framework ». In : *Frontiers in Sustainable Food Systems* 8, p. 1378436.
- Li, Yaxin., Guixia. Hao, Cheryl D. Galvani, Yizhi Meng, Leonardo De La. Fuente, H. C. Hoch et Thomas J. Burr (2007). « Type I and type IV pili of *Xylella fastidiosa* affect twitching motility, biofilm formation and cell–cell aggregation ». In : *Microbiology* 153.3, p. 719-726. issn : 1465-2080. doi : <https://doi.org/10.1099/mic.0.2006/002311-0>. url : <https://www.microbiologyresearch.org/content/journal/micro/10.1099/mic.0.2006/002311-0>.
- Lindroth, RL et MS Pajutee (1987). « Chemical analysis of phenolic glycosides : art, facts, and artifacts ». In : *Oecologia* 74, p. 144-148.
- Liu, Xia, Zhaoshan Wang, Wei Wang, Qinqin Huang, Yanfei Zeng, Yu Jin, Honglei Li, Shuhui Du et Jianguo Zhang (2022). « Origin and evolutionary history of

- Populus (Salicaceae) : Further insights based on time divergence and biogeographic analysis ». In : *Frontiers in Plant Science* 13, p. 1031087.
- Lohdi, MA, G Ye, F Weeden et BI Reisch (1994). « A simple and efficient method for DNA extraction from grapevine cultivars and ». In : *Vitis*, p. 6-13.
- Lopes, SA, DM Ribeiro, PG Roberto, SC França et JM Santos (2000). « Nicotiana tabacum as an experimental host for the study of plant-Xylella fastidiosa interactions ». In : *Plant Disease* 84.8, p. 827-830.
- Lowe-Power, Tiffany M, Devanshi Khokhani et Caitilyn Allen (2018a). « How Ralstonia solanacearum exploits and thrives in the flowing plant xylem environment ». In : *Trends in Microbiology* 26.11, p. 929-942.
- Lowe-Power, Tiffany M., Devanshi Khokhani et Caitilyn Allen (2018b). « How Ralstonia solanacearum exploits and thrives in the flowing plant xylem environment ». In : *Trends in Microbiology* 26.11, p. 929-942.
- Maes, M, S Baeyen, H De Croo, K De Smet, M Steenackers et al. (2002). « Monitoring of endophytic Brenneria salicis in willow and its relation to watermark disease ». In : *PLANT PROTECTION SCIENCE-PRAGUE*- 38, p. 528-530.
- Maes, Martine, Hanneke Huvenne et Eric Messens (mars 2009). « Brenneria salicis, the bacterium causing watermark disease in willow, resides as an endophyte in wood ». In : *Environmental microbiology* 11, p. 1453-62. doi : 10.1111/j.1462-2920.2009.01873.x.
- Maier, Berenike (2020). « Competence and transformation in Bacillus subtilis ». In : *Current Issues in Molecular Biology* 37.1, p. 57-76.
- McClean, Ali E et Daniel A Kluepfel (2010). « Biology of Brenneria rubrifaciens : screening for genes involved in pathogenesis ». In : *lína http ://ceking. ucdavis. edu/files/47896. pdf*.
- Medeiros Azevedo, Thamara de, Flávia Figueira Aburjaile, José Ribamar Costa Ferreira-Neto, Valesca Pandolfi et Ana Maria Benko-Iseppon (2021). « The endophytome (plant-associated microbiome) : methodological approaches, biological aspects, and biotech applications ». In : *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 37.12, p. 206.
- Meshram, Shweta, Sunaina Bisht et Robin Gogoi (2022). « Current development, application and constraints of biopesticides in plant disease management ». In : *Biopesticides*. Elsevier, p. 207-224.
- Mhedbi-Hajri, Nadia, Marie-Agnès Jacques et Ralf Koebnik (2011). « Adhesion mechanisms of plant-pathogenic Xanthomonadaceae ». In : *Bacterial adhesion : Chemistry, biology and physics*, p. 71-89.

- Minsavage, GV, CM Thompson, DL Hopkins, RMVBC Leite, RE Stall et al. (1994). « Development of a polymerase chain reaction protocol for detection of *Xylella fastidiosa* in plant tissue ». In : *Phytopathology* 84.5, p. 456-461.
- Naik, Sachin, Sylvester Palys, Marcos Di Falco, Adrian Tsang, Pierre Périnet, Uma Shaanker Ramanan et Selvadurai Dayanandan (2021). « Isolation and characterization of bacillus velezensis eb14, an endophytic bacterial strain antagonistic to poplar stem canker pathogen *sphaerulina musiva* and its interactions with the endophytic fungal microbiome in poplar ». In : *PhytoFrontiersTM* 1.3, p. 229-238.
- Navas Cortés, Juan Antonio, Blanca B Landa et al. (2024). « Ten Challenges to Understanding and Managing the Insect-Transmitted, Xylem-Limited Bacterial Pathogen *Xylella fastidiosa* ». In.
- Newman, Karyn L, Rodrigo PP Almeida, Alexander H Purcell et Steven E Lindow (2003). « Use of a green fluorescent strain for analysis of *Xylella fastidiosa* colonization of *Vitis vinifera* ». In : *Applied and environmental microbiology* 69.12, p. 7319-7327.
- Pace, Norman R (2018). « The small things can matter ». In : *PLoS Biology* 16.8, e3000009.
- Pais, Mary, R Sarfati, F-X Jarreau et R Goutarel (1973). « Alcaloïdes des Homalium : Structure de l'homaline, de l'hopromine, de l'hoprominol et de l'hopromalinol ». In : *Tetrahedron* 29.7, p. 1001-1010.
- Palomino, Maria Mercedes, Mariana C Allievi, Mariano Prado-Acosta, Carmen Sanchez-Rivas et Sandra M Ruzal (2010). « New method for electroporation of *Lactobacillus* species grown in high salt ». In : *Journal of microbiological methods* 83.2, p. 164-167.
- Pesenti, Lena (2024). « Bacterial Threat to Willows : Understanding the Epidemiology of *Brenneria salicis* ». In : *Plant Health Cases* 2024, phcs20240029.
- Purcell, Alexander H et Donald L Hopkins (1996). « Fastidious xylem-limited bacterial plant pathogens ». In : *Annual review of phytopathology* 34.1, p. 131-151.
- Purcell, Alexander H, Bruce C Kirkpatrick, Rodrigo Almeida, Lucia G Varela, Rhonda J Smith, Edward A Weber, Jennifer M Hashim et Carmen Gispert (1981). « Pierce's disease ». In : *Grape pest management*, p. 62-69.
- Rodríguez, M Carmen, M Teresa Alegre et Juan M Mesas (2007). « Optimization of technical conditions for the transformation of *Pediococcus acidilactici* P60 by electroporation ». In : *Plasmid* 58.1, p. 44-50.
- Roper, Caroline, Claudia Castro et Brian Ingel (2019). « *Xylella fastidiosa* : bacterial parasitism with hallmarks of commensalism ». In : *Current Opinion in Plant Biology* 50. Biotic interactions, p. 140-147. issn : 1369-5266. doi : <https://doi.org/10.1016/j.copbi.2019.05.003>.

- org/10.1016/j.pbi.2019.05.005. url : <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1369526618301523>.
- Saiki, RK, UB Gyllensten et HA Erlich (1988). « The polymerase chain reaction. » In.
- Sapp, Melanie, Erin Lewis, Stephen Moss, Ben Barrett, Susan Kirk, John G. Elphinstone et Sandra Denman (2016). « Metabarcoding of Bacteria Associated with the Acute Oak Decline Syndrome in England ». In : *Forests* 7.5. issn : 1999-4907. doi : 10.3390/f7050095. url : <https://www.mdpi.com/1999-4907/7/5/95>.
- Shuangxing, Guo et al. (1985). « Preliminary interpretation of Tertiary climate by using megafossil floras in China ». In.
- Sidstedt, M., P. Radström et J. Hedman (2020). « PCR inhibition in qPCR, dPCR and MPS-mechanisms and solutions ». In : *Analytical and bioanalytical chemistry* 412.9, p. 2009-2023. doi : 10.1007/s00216-020-02490-2. url : <https://doi.org/10.1007/s00216-020-02490-2>.
- Simpson, Michael G. (2010). « 8 - Diversity and Classification of Flowering Plants : Eudicots ». In : *Plant Systematics (Second Edition)*. Sous la dir. de Michael G. Simpson. Second Edition. San Diego : Academic Press, p. 275-448. isbn : 978-0-12-374380-0. doi : <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-374380-0.50008-7>. url : <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780123743800500087>.
- Sleumer, H. (1971). « Le genre *Casearia* Jacq. (Flacourtiaceae) en Afrique, à Madagascar et aux Mascareignes ». In : *Bulletin du Jardin botanique national de Belgique / Bulletin van de National Plantentuin van België* 41.4, p. 397-426. issn : 03039153. url : <http://www.jstor.org/stable/3667398> (visité le 26/11/2023).
- Su, C.-C., W.-L. Deng, F.-J. Jan, C.-J. Chang, H. Huang, H.-T. Shih et J. Chen (2016). « *Xylella taiwanensis* sp. nov., causing pear leaf scorch disease ». In : *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 66.11, p. 4766-4771. issn : 1466-5034. doi : <https://doi.org/10.1099/ijsem.0.001426>. url : <https://www.microbiologyresearch.org/content/journal/ijsem/10.1099/ijsem.0.001426>.
- Sun, Qiang, Yuliang Sun, M. Andrew Walker et John M. Labavitch (jan. 2013). « Vascular Occlusions in Grapevines with Pierce's Disease Make Disease Symptom Development Worse ». In : *Plant Physiology* 161.3, p. 1529-1541. issn : 0032-0889. doi : 10.1104/pp.112.208157. eprint : https://academic.oup.com/plphys/article-pdf/161/3/1529/36011249/plphys_v161_3_1529.pdf. url : <https://doi.org/10.1104/pp.112.208157>.
- Thompson, Keith et Martin A. Collins (1996). « Improvement in electroporation efficiency for *Lactobacillus plantarum* by the inclusion of high concentrations of

- glycine in the growth medium ». In : *Journal of Microbiological Methods* 26.1, p. 73-79. issn : 0167-7012. doi : [https://doi.org/10.1016/0167-7012\(96\)00845-7](https://doi.org/10.1016/0167-7012(96)00845-7). url : <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0167701296008457>.
- Tuskan, G. A. et al. (2006). « The Genome of Black Cottonwood, *Populus trichocarpa* (Torr. & Gray) ». In : *Science* 313.5793, p. 1596-1604. doi : 10.1126/science.1128691. eprint : <https://www.science.org/doi/pdf/10.1126/science.1128691>. url : <https://www.science.org/doi/abs/10.1126/science.1128691>.
- Wei, Suyun, Yonghua Yang et Tongming Yin (2020). « The chromosome-scale assembly of the willow genome provides insight into Salicaceae genome evolution ». In : *Horticulture research* 7.
- Wells, JM, BC Raju, G Nyland et SK Lowe (1981). « Medium for isolation and growth of bacteria associated with plum leaf scald and phony peach diseases ». In : *Applied and environmental microbiology* 42.2, p. 357-363.
- Yadeta, Koste A et Bart PH J. Thomma (2013). « The xylem as battleground for plant hosts and vascular wilt pathogens ». In : *Frontiers in plant science* 4, p. 97.
- Yan, Yan, Eiko E Kuramae, Mattias de Hollander, Peter GL Klinkhamer et Johannes A van Veen (2017). « Functional traits dominate the diversity-related selection of bacterial communities in the rhizosphere ». In : *The ISME journal* 11.1, p. 56-66.
- Yi, Yanglei et Oscar P Kuipers (2017). « Development of an efficient electroporation method for rhizobacterial *Bacillus mycoides* strains ». In : *Journal of microbiological methods* 133, p. 82-86.
- Zhang, Ping, Hao Xin et Theo van der Lee (2023). « Tree pathogens *Armillaria solidipes* influence the biocontrol activity of *Bacillus velezensis* BY6 ». In : *Biological Control* 179, p. 105176.
- Zicca, Stefania, Palmira De Bellis, Mario Masiello, Maria Saponari, Pasquale Saldarelli, Donato Boscia et Angelo Sisto (2020). « Antagonistic activity of olive endophytic bacteria and of *Bacillus* spp. strains against *Xylella fastidiosa* ». In : *Microbiological Research* 236, p. 126467. issn : 0944-5013. doi : <https://doi.org/10.1016/j.micres.2020.126467>. url : <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S094450131931465X>.
- Zimmermann, Martin Huldrych (2013). *Xylem structure and the ascent of sap*. Springer Science & Business Media.

ANNEXES

A Cycle PCR avec la polymérase MM Phusion

Table 1 – Cycle PCR 16S.

Étapes	Température [°C]	Temps [mm :ss]	Cycles
Dénaturation initiale	95	05 :00	1
Dénaturation	95	01 :00	30
fixation PNA	75	10 :00	30
Appariement	61	00 :30	30
Élongation	72	01 :30	30
Élongation finale	72	10 :00	1
Conservation	4	/	/

B Graphe DO-CFU

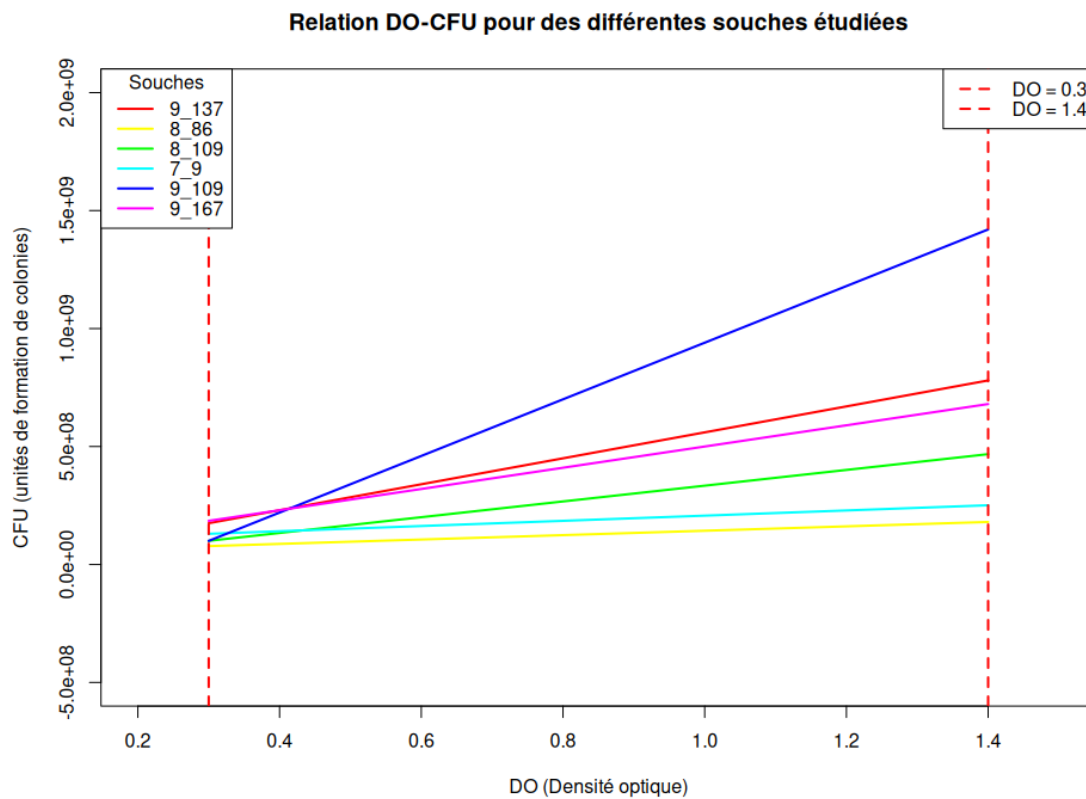


Figure 1 – Graphique représentant le lien entre la DO et les CFU sur le domaine de DO étudié.

C Tableau récapitulatif de l'ensemble des souches alignées avec BLAST sur la base de donnée NCBI

D Extraction d'ADN T0

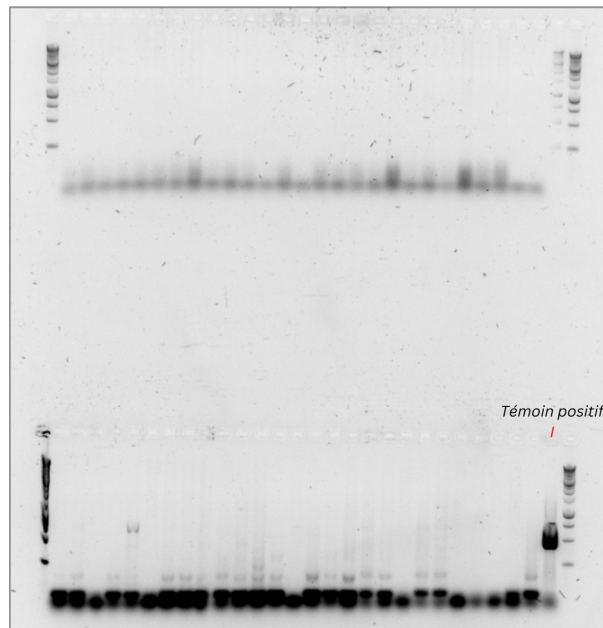


Figure 2 – Gel T0 vérifiant la présence de XF et BS dans les plants de tabac. Les échelles utilisées à gauche et à droite sont des marqueurs de poids moléculaire (1 kb, Promega).

E Amplification MM Phusion

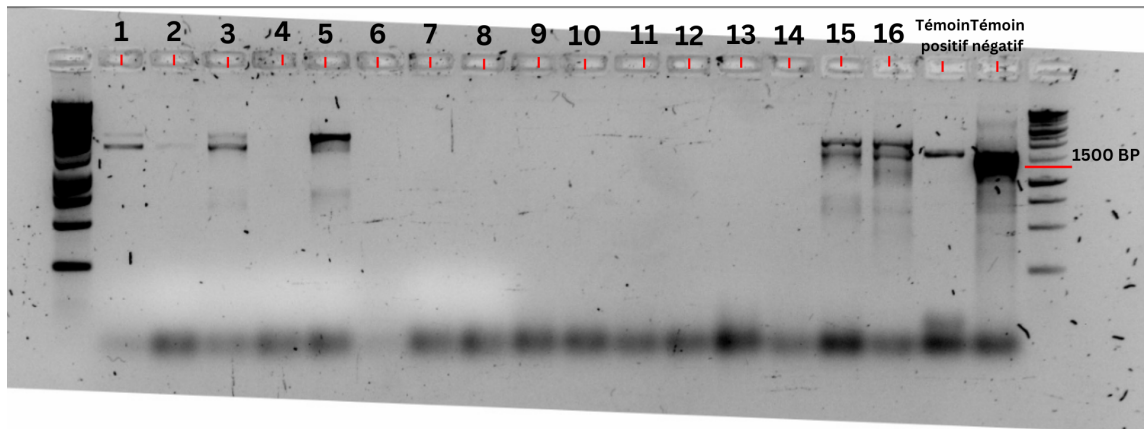


Figure 3 – Gel PCR de 16 échantillons d'ADN de sève amplifiés avec la polymérase MM Phusion. Les amplicons 1, 3, 5 15 et 16 montrent tous deux amplifications d'ADN de longueur différente : environ 1500 paires de bases et environ 2000 paires de bases. Les échelles utilisées à gauche et à droite sont des marqueurs de poids moléculaire (1 kb, Promega).

F Tableau d'identification des espèces bactériennes détectées plusieurs fois

Table 2 – Identification des espèces bactériennes détectées plusieurs fois avec BLAST, de leur famille bactérienne correspondante et leur occurrence.

Espèces	Famille	Occurrence
<i>Bacillus velezensis</i>	<i>Bacillaceae</i>	74
<i>Bacillus tequilensis</i>	<i>Bacillaceae</i>	23
<i>Bacillus subtilis</i>	<i>Bacillaceae</i>	18
<i>Bacillus wiedmannii</i>	<i>Bacillaceae</i>	17
<i>Pseudomonas coleopterorum</i>	<i>Pseudomonadaceae</i>	17
<i>Bacillus cereus</i>	<i>Bacillaceae</i>	15
<i>Bacillus sp.</i>	<i>Bacillaceae</i>	16
<i>Bacillus mycoides</i>	<i>Bacillaceae</i>	13
<i>Priestia aryabhattai</i>	<i>Bacillaceae</i>	11
<i>Bacillus spizizenii</i>	<i>Bacillaceae</i>	8
<i>Ralstonia pickettii</i>	<i>Burkholderiaceae</i>	8
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	<i>Bacillaceae</i>	6
<i>Bacillus safensis</i>	<i>Bacillaceae</i>	6
<i>Pseudomonas sp.</i>	<i>Pseudomonadaceae</i>	6
<i>Peribacillus frigorigerans</i>	<i>Paenibacillaceae</i>	5
<i>Pseudomonas rhizosphaerae</i>	<i>Pseudomonadaceae</i>	5
<i>Psychrobacillus psychrodurans</i>	<i>Paenibacillaceae</i>	5
<i>Bacillus arachidis</i>	<i>Bacillaceae</i>	4
<i>Bacillus thuringiensis</i>	<i>Bacillaceae</i>	4
<i>Erwinia sp.</i>	<i>Enterobacteriaceae</i>	4
<i>Priestia flexa</i>	<i>Bacillaceae</i>	4
<i>Priestia megaterium</i>	<i>Bacillaceae</i>	4
<i>Bacillus inaquosorum</i>	<i>Bacillaceae</i>	3
<i>Bacillus licheniformis</i>	<i>Bacillaceae</i>	3
<i>Bacillus proteolyticus</i>	<i>Bacillaceae</i>	3
<i>Bacillus zanthoxyli</i>	<i>Bacillaceae</i>	3
<i>Curtobacterium oceanosedimentum</i>	<i>Microbacteriaceae</i>	3
<i>Pseudomonas graminis</i>	<i>Pseudomonadaceae</i>	3
<i>Bacillus pumilus</i>	<i>Bacillaceae</i>	2
<i>Curtobacterium sp.</i>	<i>Microbacteriaceae</i>	2
<i>Frigoribacterium faeni</i>	<i>Micrococcaceae</i>	2
<i>Heyndrickxia oleronia</i>	<i>Bacillaceae</i>	2
<i>Lysinibacillus sp.</i>	<i>Bacillaceae</i>	2
<i>Pseudomonas baltica</i>	<i>Pseudomonadaceae</i>	2
<i>Pseudomonas trivialis</i>	<i>Pseudomonadaceae</i>	2
<i>Ralstonia insidiosa</i>	<i>Burkholderiaceae</i>	2
<i>Roseomonas mucosa</i>	<i>Acetobacteraceae</i>	2
<i>Rummeliibacillus pycnus</i>	<i>Bacillaceae</i>	2
<i>Staphylococcus hominis</i>	<i>Staphylococcaceae</i>	2
<i>Staphylococcus saprophyticus</i>	<i>Staphylococcaceae</i>	2

G Tableau récapitulatif de l'ensemble des souches alignées avec BLAST sur la base de donnée NCBI

ID est le numéro de la souche. **EA** est l'espèce arbustive où Pc, Pn, Pt, Sa, Sf, Sc ront respectivement *P. canescens*, *P. nigra*, *P. tremula*, *S. alba*, *S. fragilis* et *S. caprea*. **RA** représente les régions amplifiées du gène codant pour l'ARNr 16S. **PI**, représente l'identité par paires entre les séquences "query" et "hit". **EV** représente la E-valeur.

Table 3 – Tableau récapitulatif de l'ensemble des souches alignées avec CLAST sur la base de donnée NCBI.

ID	EA souche bactérienne	RA	Accession	PI [%]	EV	Bit-score
11-12_11	Pc <i>Pseudomonas graminis</i>	V1-V9	PQ614800	99.5	0	2348.37
11-12_13	Pc <i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	V1-V9	PP723394	99.96	0	2490.84
11-12_29	Pc <i>Sphingomonas aquatilis</i>	V1-V9	NR_113867	99.4	0	2269.92
11-12_30	Pc <i>Curtobacterium oceanosedimentum</i>	V1-V9	NR_104839	99.1	0	2307.8
11-12_33	Pc <i>Curtobacterium oceanosedimentum</i>	V1-V9	NR_104839	99.2	0	2382.63
11-12_34	Pc <i>Curtobacterium oceanosedimentum</i>	V1-V9	NR_104839	99.8	0	2272.63
11-12_35	Pc <i>Curtobacterium sp.</i>	V1-V9	PQ215100	99.9	0	2448.46
11-12_49	Pc <i>Ralstonia pickettii</i>	V1-V9	MT827171	99.9	0	2479.12
11-12_50	Pc <i>Pseudomonas sp.</i>	V1-V9	OP986397	98.8	0	2381.73
11-12_52	Pc <i>Curtobacterium sp.</i>	V1-V9	OQ438791	100.0	0	2515.18
16_11	Pc <i>Pseudomonas coleopterorum</i>	V1-V9	NR_137215	99.6	0	2401.57
16_12	Pc <i>Bacillus velezensis</i>	V1-V9	NR_116240	99.8	0	2515.18
16_13	Pc <i>Priestia aryabhattai</i>	V1-V9	NR_115953	99.9	0	2492.64
16_14	Pc <i>Frigoribacterium faeni</i>	V1-V9	NR_026511	99.3	0	2213.12
16_17	Pc <i>Bacillus velezensis</i>	V1-V9	NR_116240	99.9	0	2515.18
16_2	Pc <i>Pseudomonas coleopterorum</i>	V1-V9	NR_137215	99.8	0	2311.4
16_23	Pc <i>Bacillus velezensis</i>	V1-V9	NR_116240	99.9	0	2488.13
16_24	Pc <i>Bacillus velezensis</i>	V1-V9	NR_116240	99.9	0	2545.84
16_26	Pc <i>Pseudomonas coleopterorum</i>	V1-V9	NR_137215	99.6	0	2436.74
16_30	Pc <i>Bacillus velezensis</i>	V1-V9	NR_075005	99.8	0	2551.25
16_31	Pc <i>Pseudomonas coleopterorum</i>	V1-V9	NR_137215	99.7	0	2471.0
16_32	Pc <i>Methylobacterium adhaesivum</i>	V1-V9	NR_125492	99.1	0	2332.14
16_34	Pc <i>Priestia megaterium</i>	V1-V9	NR_116873	100.0	0	2356.49
16_5	Pc <i>Pseudomonas coleopterorum</i>	V1-V9	NR_137215	99.5	0	2184.26
16_6	Pc <i>Bacillus velezensis</i>	V1-V9	NR_075005	99.8	0	2529.61
16_7	Pc <i>Pseudomonas coleopterorum</i>	V1-V9	NR_137215	99.7	0	2416.9
16_8	Pc <i>Pseudomonas coleopterorum</i>	V1-V9	NR_137215	99.7	0	2424.11
16_9	Pc <i>Pseudomonas coleopterorum</i>	V1-V9	NR_137215	99.7	0	2425.92
7-9_104	Pc <i>Pseudomonas coleopterorum</i>	V1-V9	NR_137215	98.5	0	2241.97
7-9_105	Pc <i>Pseudomonas rhizosphaerae</i>	V1-V9	PQ565597	99.8	0	2471.0
7-9_107	Pc <i>Pseudomonas coleopterorum</i>	V1-V9	NR_137215	99.8	0	2455.67
7-9_108	Pc <i>Paenibacillus woosongensis</i>	V1-V9	NR_043229	99.5	0	2273.53

ID	EA souche bactérienne	RA	Accession	PI [%]	EV	Bit-score
7-9_110	Pc <i>Peribacillus frigoritolerans</i>	V1-V9	PQ093534	100.0	0	2533.22
7-9_111	Pc <i>Frigoribacterium sp.</i>	V1-V9	CP139002	99.7	0	2351.08
7-9_112A	Pc <i>Staphylococcus epidermidis</i>	V1-V9	CP170251	99.96	0	2532.31
7-9_113	Pc <i>Bacillus licheniformis</i>	V1-V9	OR206175	99.2	0	2506.17
7-9_114	Pc <i>Psychrobacillus psychrodurans</i>	V1-V9	MG571696	99.96	0	2523.3
7-9_114	Pc <i>Psychrobacillus psychrodurans</i>	V1-V9	MG571696	99.96	0	2523.3
7-9_115	Pc <i>Bacillus mycoides</i>	V1-V9	NR_113990	99.96	0	2328.53
7-9_116	Pc <i>Priestia aryabhattai</i>	V1-V9	PQ510638	99.4	0	2370.91
7-9_117	Pc <i>Bacillus tequilensis</i>	V1-V9	OR898788	99.96	0	2420.51
7-9_118	Pc <i>Peribacillus frigoritolerans</i>	V1-V9	NR_117474	99.9	0	2540.43
7-9_119	Pc <i>Lysinibacillus endophyticus</i>	V1-V9	NR_146821	98.0	0	2156.31
7-9_120	Pc <i>Pigmentiphaga sp.</i>	V1-V9	KT949373	99.9	0	2489.94
7-9_121	Pc <i>Bacillus mycoides</i>	V1-V9	PQ569333	82.2	6.10 ⁻⁸	275.398
7-9_122	Pc <i>Paenibacillus sp.</i>	V1-V9	CP150300	99.6	0	2389.85
7-9_123	Pc <i>Cytobacillus purgationiresistens</i>	V1-V9	NR_108492	98.2	0	2326.73
7-9_124	Pc <i>Bacillus velezensis</i>	V1-V9	NR_075005	99.7	0	2228.45
7-9_125	Pc <i>Paenibacillus lautus</i>	V1-V9	NR_040882	99.3	0	2351.98
7-9_126	Pc <i>Pseudomonas baltica</i>	V1-V9	NR_181571	99.8	0	2435.83
7-9_127	Pc <i>Pseudomonas baltica</i>	V1-V9	NR_181571	99.8	0	2455.67
7-9_129	Pc <i>Pseudomonas rhizosphaerae</i>	V1-V9	PQ565597	99.8	0	2433.13
7-9_130	Pc <i>Frigoribacterium faeni</i>	V1-V9	NR_026511	99.2	0	2300.58
7-9_131	Pc <i>Pigmentiphaga litoralis</i>	V1-V9	NR_044530	99.7	0	2435.83
7-9_132	Pc <i>Bacillus cereus</i>	V1-V9	PQ454117	100.0	0	2535.02
7-9_133	Pc <i>Pseudomonas rhizosphaerae</i>	V1-V9	NR_029063	99.8	0	2434.03
7-9_134	Pc <i>Bacillus mycoides</i>	V1-V9	NR_113990	99.96	0	2328.53
7-9_135	Pc <i>Bacillus spizizenii</i>	V1-V9	PQ600429	100.0	0	2553.05
7-9_136	Pc <i>Pseudomonas rhizosphaerae</i>	V1-V9	NR_029063	99.8	0	2411.49
7-9_160	Pc <i>Bacillus velezensis</i>	V1-V9	CP173038	99.8	0	2519.69
7-9_161	Pc <i>Pseudomonas rhizosphaerae</i>	V1-V9	PP723419	99.7	0	2465.59
7-9_164	Pc <i>Bacillus wiedmannii</i>	V1-V9	NR_152692	98.1	0	2072.46
7-9_168	Pc <i>Pseudomonas coleopterorum</i>	V1-V9	NR_137215	99.7	0	2394.36
7-9_169	Pc <i>Pseudomonas graminis</i>	V1-V9	PQ614800	98.6	0	2272.63
7-9_173	Pc <i>Pseudomonas sp.</i>	V1-V9	MH769570	99.6	0	2448.46
7-9_174	Pc <i>Pseudomonas coleopterorum</i>	V1-V9	OM827325	99.8	0	2465.59
7-9_175	Pc <i>Pseudomonas coleopterorum</i>	V1-V9	OM827325	99.7	0	2462.88
7-9_25	Pc <i>Bacillus velezensis</i>	V1-V9	NR_116240	99.9	0	2526.0
7-9_26	Pc <i>Bacillus wiedmannii</i>	V1-V9	NR_152692	99.96	0	2328.53
7-9_29	Pc <i>Pseudomonas coleopterorum</i>	V1-V9	NR_137215	99.6	0	2416.9
7-9_30	Pc <i>Pseudomonas coleopterorum</i>	V1-V9	NR_137215	99.8	0	2450.26
7-9_31	Pc <i>Bacillus tequilensis</i>	V1-V9	NR_104919	99.9	0	2404.28
7-9_32	Pc <i>Neobacillus niacini</i>	V1-V9	NR_113777	98.6	0	2126.56
7-9_33	Pc <i>Bacillus velezensis</i>	V1-V9	NR_116240	99.9	0	2489.94
7-9_34	Pc <i>Bacillus mycoides</i>	V1-V9	NR_113990	99.9	0	2516.08
7-9_38	Pc <i>Bacillus velezensis</i>	V1-V9	NR_116240	99.9	0	2515.18
7-9_40	Pc <i>Pseudomonas graminis</i>	V1-V9	PQ614800	99.2	0	2335.75

ID	EA souche bactérienne	RA	Accession	PI [%]	EV	Bit-score
7-9_41	Pc <i>Bacillus velezensis</i>	V1-V9	NR_116240	99.9	0	2542.23
7-9_90	Pc <i>Rummeliibacillus sp.</i>	V1-V9	NR_041521	99.1	0	2445.75
11-12_12	Pc <i>Curtobacterium herbarum</i>	V3-V4	NR_025461	99.0	0	736.159
7-9_166	Pc <i>Bacillus velezensis</i>	V3-V4	NR_164882	100.0	0	776.735
16_15	Pc <i>Priestia flexa</i>	V3-V4	NR_074244	99.4	4.10^{-135}	480.081
16_16	Pc <i>Priestia flexa</i>	V3-V4	NR_074244	99.4	4.10^{-135}	480.081
16_20	Pc <i>Priestia flexa</i>	V3-V4	NR_113800	100.0	0	780.342
16_22	Pc <i>Priestia flexa</i>	V3-V4	NR_113800	100.0	0	778.538
16_25	Pc <i>Rathayibacter iranicus</i>	V3-V4	NR_113800	100.0	0	778.538
16_1	Pc <i>Bacillus zanthoxyli</i>	V3-V4	NR_074244	99.4	4.10^{-135}	480.081
16_21	Pc <i>Bacillus zanthoxyli</i>	V3-V4	NR_113800	100.0	0	780.342
7-9_42	Pc <i>Bacillus</i>	V1-V2	NR_117946	100.0	5.10^{-141}	499.016
16_35	Pn <i>Bacillus wiedmannii</i>	V1-V9	NR_152692	99.8	0	2324.93
16_36	Pn <i>Bacillus stratosphericus</i>	V1-V9	NR_118441	100.0	0	2551.25
16_38	Pn <i>Bacillus wiedmannii</i>	V1-V9	NR_152692	99.9	0	2328.53
16_39	Pn <i>Bacillus velezensis</i>	V1-V9	NR_116240	99.9	0	2524.2
16_40	Pn <i>Bacillus tequilensis</i>	V1-V9	NR_104919	99.9	0	2505.26
16_41	Pn <i>Bacillus wiedmannii</i>	V1-V9	NR_152692	98.6	0	2395.26
16_42	Pn <i>Bacillus tequilensis</i>	V1-V9	NR_104919	99.9	0	2529.61
7-9_100	Pn <i>Sporosarcina sp.</i>	V1-V9	CP152016	99.9	0	2511.58
7-9_101	Pn <i>Bacillus subtilis</i>	V1-V9	PQ459614	99.96	0	2535.92
7-9_102	Pn <i>Bacillus velezensis</i>	V1-V9	CP173038	99.96	0	2517.89
7-9_103	Pn <i>Bacillus subtilis</i>	V1-V9	PQ459614	99.96	0	2526.9
7-9_14	Pn <i>Priestia aryabhattai</i>	V1-V9	NR_115953	100.0	0	2450.26
7-9_14	Pn <i>Priestia aryabhattai</i>	V1-V9	NR_115953	100.0	0	2450.26
7-9_15	Pn <i>Metabacillus idriensis</i>	V1-V9	NR_043268	100.0	0	2545.84
7-9_155	Pn <i>Bacillus subtilis</i>	V1-V9	PQ651427	98.8	0	2253.69
7-9_156	Pn <i>Bacillus safensis</i>	V1-V9	NR_041794	99.8	0	2534.12
7-9_159	Pn <i>Bacillus velezensis</i>	V1-V9	CP173038	99.9	0	2477.31
7-9_16	Pn <i>Neobacillus drenthensis</i>	V1-V9	NR_114085	99.8	0	2302.38
7-9_85	Pn <i>Bacillus sp.</i>	V1-V9	PQ522130	99.96	0	2525.1
7-9_86	Pn <i>Priestia megaterium</i>	V1-V9	PQ620142	99.8	0	2411.49
7-9_87	Pn <i>Bacillus sp.</i>	V1-V9	HM635212	99.1	0	2432.23
7-9_88	Pn <i>Rummeliibacillus pycnus</i>	V1-V9	NR_041521	99.0	0	2441.24
7-9_89	Pn <i>Bacillus sp.</i>	V1-V9	KU983803	99.2	0	2385.34
7-9_90	Pn <i>Rummeliibacillus pycnus</i>	V1-V9	NR_041521	99.1	0	2445.75
7-9_91	Pn <i>Lysinibacillus sp.</i>	V1-V9	PQ306569	99.9	0	2491.74
7-9_93	Pn <i>Lysinibacillus sp.</i>	V1-V9	PQ306569	99.8	0	2398.87
7-9_97	Pn <i>Priestia aryabhattai</i>	V1-V9	PQ510638	99.96	0	2517.89
7-9_99	Pn <i>Bacillus sp.</i>	V1-V9	OR889465	99.5	0	2350.17
7-9_158	Pn <i>Bacillus subtilis</i>	V3-V4	NR_164882	100.0	0	776.735
7-9_157	Pn <i>Bacillus zanthoxyli</i>	V3-V4	NR_164882	100.0	0	776.735
7-9_1	Pt <i>Priestia megaterium</i>	V1-V9	NR_112636	99.96	0	2541.33
7-9_10	Pt <i>Bacillus wiedmannii</i>	V1-V9	NR_152692	99.96	0	2373.62
7-9_12	Pt <i>Bacillus velezensis</i>	V1-V9	NR_116240	99.8	0	2517.89

ID	EA souche bactérienne	RA	Accession	PI [%]	EV	Bit-score
7-9_13	Pt <i>Bacillus mobilis</i>	V1-V9	NR_157731	98.7	0	2276.24
7-9_137	Pt <i>Bacillus subtilis</i>	V1-V9	CP174155	99.96	0	2516.08
7-9_138	Pt <i>Priestia aryabhattai</i>	V1-V9	NR_115953	99.8	0	2511.58
7-9_139	Pt <i>Bacillus subtilis</i>	V1-V9	CP174155	99.96	0	2411.49
7-9_140	Pt <i>Priestia aryabhattai</i>	V1-V9	NR_115953	99.9	0	2333.94
7-9_142	Pt <i>Priestia aryabhattai</i>	V1-V9	NR_115953	99.8	0	2525.1
7-9_143	Pt <i>Bacillus sp.</i>	V1-V9	PQ608401	99.96	0	2564.78
7-9_144	Pt <i>Bacillus pumilus</i>	V1-V9	PP747938	99.96	0	2548.54
7-9_147	Pt <i>Bacillus velezensis</i>	V1-V9	PQ459609	99.9	0	2547.64
7-9_148	Pt <i>Bacillus velezensis</i>	V1-V9	PQ609703	99.96	0	2442.15
7-9_149	Pt <i>Priestia aryabhattai</i>	V1-V9	NR_115953	99.9	0	2456.57
7-9_151	Pt <i>Bacillus velezensis</i>	V1-V9	PQ609703	99.9	0	2509.77
7-9_153	Pt <i>Bacillus sp.</i>	V1-V9	PQ522130	99.9	0	2392.55
7-9_3	Pt <i>Cytobacillus kochii</i>	V1-V9	NR_117050	99.8	0	2520.59
7-9_4	Pt <i>Priestia megaterium</i>	V1-V9	NR_112636	99.9	0	2544.94
7-9_46	Pt <i>Bacillus tequilensis</i>	V1-V9	NR_104919	99.9	0	2495.35
7-9_48	Pt <i>Bacillus cereus</i>	V1-V9	PQ625838	99.96	0	2550.35
7-9_48	Pt <i>Bacillus cereus</i>	V1-V9	PQ625838	99.96	0	2550.35
7-9_5	Pt <i>Bacillus safensis</i>	V1-V9	NR_041794	99.1	0	2460.18
7-9_50	Pt <i>Bacillus velezensis</i>	V1-V9	NR_116240	99.9	0	2524.2
7-9_51	Pt <i>Bacillus mycoides</i>	V1-V9	NR_113990	100.0	0	2325.83
7-9_52	Pt <i>Bacillus velezensis</i>	V1-V9	NR_075005	99.8	0	2529.61
7-9_53	Pt <i>Heyndrickxia oleronia</i>	V1-V9	NR_043325	99.7	0	2481.82
7-9_54	Pt <i>Paenibacillus segetis</i>	V1-V9	NR_151983	98.5	0	2357.39
7-9_55	Pt <i>Bacillus tequilensis</i>	V1-V9	NR_104919	99.9	0	2370.91
7-9_57	Pt <i>Bacillus mycoides</i>	V1-V9	NR_113990	99.96	0	2496.25
7-9_58	Pt <i>Bacillus velezensis</i>	V1-V9	NR_116240	99.9	0	2531.41
7-9_59	Pt <i>Bacillus velezensis</i>	V1-V9	NR_116240	99.9	0	2535.02
7-9_60	Pt <i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	V1-V9	CP087391	91.5	0	740.668
7-9_61	Pt <i>Neobacillus bataviensis</i>	V1-V9	NR_114093	99.3	0	2402.47
7-9_62	Pt <i>Bacillus mycoides</i>	V1-V9	NR_113990	100.0	0	2338.45
7-9_63	Pt <i>Bacillus mycoides</i>	V1-V9	NR_113990	99.96	0	2321.32
7-9_64	Pt <i>Bacillus pumilus</i>	V1-V9	NR_043242	99.1	0	2284.35
7-9_65	Pt <i>Bacillus licheniformis</i>	V1-V9	NR_118996	99.96	0	2323.12
7-9_66	Pt <i>Heyndrickxia oleronia</i>	V1-V9	NR_043325	99.9	0	2449.36
7-9_69	Pt <i>Psychrobacillus psychrodurans</i>	V1-V9	NR_025409	99.4	0	2471.0
7-9_7	Pt <i>Staphylococcus hominis</i>	V1-V9	NR_041323	99.8	0	2489.03
7-9_70	Pt <i>Bacillus pseudomycoides</i>	V1-V9	NR_113991	100.0	0	2345.67
7-9_71	Pt <i>Bacillus velezensis</i>	V1-V9	CP174125	99.8	0	2425.01
7-9_72	Pt <i>Bacillus tequilensis</i>	V1-V9	NR_104919	99.96	0	2499.85
7-9_73	Pt <i>Bacillus wiedmannii</i>	V1-V9	NR_152692	99.9	0	2495.35
7-9_74	Pt <i>Solibacillus silvestris</i>	V1-V9	NR_028865	99.3	0	2427.72
7-9_76	Pt <i>Psychrobacillus psychrodurans</i>	V1-V9	NR_025409	99.0	0	2312.3
7-9_79	Pt <i>Bacillus mycoides</i>	V1-V9	NR_113990	100.0	0	2538.63
7-9_80	Pt <i>Priestia sp.</i>	V1-V9	PQ626871	99.9	0	2231.15

ID	EA souche bactérienne	RA	Accession	PI [%]	EV	Bit-score
7-9_82	Pt <i>Peribacillus asahii</i>	V1-V9	PQ394592	99.9	0	2479.12
7-9_9	Pt <i>Bacillus velezensis</i>	V1-V9	NR_075005	99.7	0	2491.74
7-9_8	Pt <i>Psychrobacillus psychrodurans</i>	V3-V4	NR_164882	100.0	0	776.735
7-9_47	Pt <i>Bacillus subtilis</i>	V3-V4	NR_164882	100.0	0	776.735
7-9_67	Pt <i>Brevibacillus borstelensis</i>	V3-V4	NR_164882	100.0	0	776.735
7-9_11	Pt <i>Ralstonia pickettii</i>	V3-V4	NR_164882	100.0	0	776.735
7-9_2	Pt <i>Bacillus aerius</i>	V3-V4	NR_164882	100.0	0	776.735
7-9_56	Pt <i>Bacillus wiedmannii</i>	V3-V4	NR_164882	100.0	0	776.735
11-12_14	Sa <i>Pseudomonas sp.</i>	V1-V9	MZ314526	100.0	0	2489.94
11-12_15	Sa <i>Staphylococcus saprophyticus</i>	V1-V9	PQ637354	99.9	0	2557.56
11-12_15	Sa <i>Staphylococcus saprophyticus</i>	V1-V9	PQ637354	99.9	0	2557.56
11-12_16	Sa <i>Pseudomonas sp.</i>	V1-V9	MZ314526	100.0	0	2489.94
11-12_20	Sa <i>Erwinia sp.</i>	V1-V9	MK070132	99.9	0	2491.74
11-12_21	Sa <i>Pseudomonas trivialis</i>	V1-V9	NR_028987	99.9	0	2432.23
11-12_23	Sa <i>Erwinia sp.</i>	V1-V9	MK070132	99.9	0	2478.21
11-12_24	Sa <i>Erwinia sp.</i>	V1-V9	MK070132	99.9	0	2521.49
11-12_25	Sa <i>Erwinia sp.</i>	V1-V9	MK070132	99.9	0	2477.31
11-12_36	Sa <i>Fronidihabitans sp.</i>	V1-V9	MN989064	99.1	0	2406.98
11-12_37	Sa <i>Roseomonas mucosa</i>	V1-V9	NR_028857	99.2	0	2205.0
11-12_38	Sa <i>Roseomonas mucosa</i>	V1-V9	NR_028857	100.0	0	2381.73
11-12_53	Sa <i>Pseudomonas sp.</i>	V1-V9	MZ314526	99.5	0	2461.08
11-12_57	Sa <i>Pseudomonas trivialis</i>	V1-V9	CP142174	99.6	0	2479.12
3-6_103	Sa <i>Bacillus subtilis</i>	V1-V9	OQ283698	90.7	2.10^{-163}	589.185
3-6_105	Sa <i>Priestia aryabhattai</i>	V1-V9	PQ510638	100.0	0	2569.28
3-6_106	Sa <i>Bacillus velezensis</i>	V1-V9	NR_116240	99.9	0	2318.62
3-6_107	Sa <i>Bacillus inaquosorum</i>	V1-V9	NR_104873	99.5	0	2037.29
3-6_108	Sa <i>Bacillus tequilensis</i>	V1-V9	NR_104919	99.8	0	2529.61
3-6_109	Sa <i>Bacillus velezensis</i>	V1-V9	NR_116240	99.9	0	2495.35
3-6_110	Sa <i>Bacillus velezensis</i>	V1-V9	NR_075005	99.7	0	2439.44
3-6_111	Sa <i>Bacillus tequilensis</i>	V1-V9	NR_104919	99.9	0	2324.03
3-6_112	Sa <i>Bacillus velezensis</i>	V1-V9	NR_075005	99.8	0	2446.65
3-6_113	Sa <i>Bacillus velezensis</i>	V1-V9	NR_116240	99.9	0	2531.41
3-6_114	Sa <i>Bacillus subtilis</i>	V1-V9	NR_102783	99.6	0	2233.86
3-6_115	Sa <i>Bacillus velezensis</i>	V1-V9	NR_116240	99.9	0	2431.33
3-6_117	Sa <i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	V1-V9	NR_117946	99.6	0	2224.84
3-6_118	Sa <i>Pseudomonas sp.</i>	V1-V9	MZ490635	99.96	0	2523.3
3-6_120	Sa <i>Bacillus inaquosorum</i>	V1-V9	NR_104873	99.9	0	2092.29
3-6_156	Sa <i>Bacillus velezensis</i>	V1-V9	CP173038	99.96	0	2505.26
3-6_157	Sa <i>Bacillus velezensis</i>	V1-V9	PQ459610	99.96	0	2535.92
3-6_158	Sa <i>Bacillus proteolyticus</i>	V1-V9	NR_157735	99.96	0	2528.71
3-6_159	Sa <i>Bacillus cereus</i>	V1-V9	PQ625838	99.7	0	2521.49
3-6_159	Sa <i>Bacillus cereus</i>	V1-V9	PQ625838	99.7	0	2521.49
3-6_160	Sa <i>Bacillus cereus</i>	V1-V9	PQ625838	99.96	0	2510.67
3-6_161	Sa <i>Bacillus velezensis</i>	V1-V9	NR_075005	99.8	0	2540.43
3-6_164	Sa <i>Bacillus tequilensis</i>	V1-V9	NR_104919	99.9	0	2501.66

ID	EA souche bactérienne	RA	Accession	PI [%]	EV	Bit-score
3-6_165	Sa <i>Bacillus thuringiensis</i>	V1-V9	CP170495	99.96	0	2355.58
3-6_166	Sa <i>Bacillus spizizenii</i>	V1-V9	PQ600429	100.0	0	2565.68
3-6_167	Sa <i>Bacillus subtilis</i>	V1-V9	NR_113265	100.0	0	2545.84
3-6_168	Sa <i>Bacillus velezensis</i>	V1-V9	PQ459609	99.96	0	2550.35
3-6_169	Sa <i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	V1-V9	CP171208	99.96	0	2552.15
3-6_170	Sa <i>Bacillus sp.</i>	V1-V9	PQ522130	99.96	0	2512.48
3-6_171	Sa <i>Bacillus velezensis</i>	V1-V9	NR_075005	99.8	0	2522.4
3-6_172	Sa <i>Bacillus spizizenii</i>	V1-V9	PQ609718	99.96	0	2570.19
3-6_173	Sa <i>Bacillus velezensis</i>	V1-V9	CP169520	99.9	0	2554.86
3-6_174	Sa <i>Bacillus velezensis</i>	V1-V9	NR_116240	99.9	0	2529.61
3-6_175	Sa <i>Bacillus velezensis</i>	V1-V9	CP169520	99.96	0	2537.72
3-6_176	Sa <i>Bacillus sp.</i>	V1-V9	PQ522130	99.96	0	2512.48
3-6_177	Sa <i>Bacillus velezensis</i>	V1-V9	CP169520	99.96	0	2537.72
3-6_178	Sa <i>Lysinibacillus macroides</i>	V1-V9	PP514629	100.0	0	2556.66
3-6_18	Sa <i>Bacillus thuringiensis</i>	V1-V9	OK335881	99.9	0	2529.61
3-6_19	Sa <i>Bacillus velezensis</i>	V1-V9	NR_116240	99.9	0	2512.48
3-6_20	Sa <i>Bacillus mycoides</i>	V1-V9	NR_113990	100.0	0	2560.27
3-6_22	Sa <i>Bacillus tequilensis</i>	V1-V9	NR_104919	99.9	0	2524.2
3-6_23	Sa <i>Peribacillus frigoritolerans</i>	V1-V9	PQ344050	99.96	0	2555.76
3-6_25	Sa <i>Bacillus cereus</i>	V1-V9	PQ625838	99.96	0	2559.36
3-6_26	Sa <i>Peribacillus sp.</i>	V1-V9	PQ241667	99.96	0	2559.36
3-6_27	Sa <i>Peribacillus frigoritolerans</i>	V1-V9	CP158190	99.96	0	2548.54
3-6_28	Sa <i>Bacillus velezensis</i>	V1-V9	NR_116240	99.8	0	2508.87
3-6_29	Sa <i>Bacillus safensis</i>	V1-V9	PQ621869	99.8	0	2437.64
3-6_31	Sa <i>Bacillus safensis</i>	V1-V9	NR_041794	99.9	0	2558.46
3-6_32	Sa <i>Bacillus wiedmannii</i>	V1-V9	NR_152692	99.96	0	2519.69
3-6_33	Sa <i>Brevundimonas sp.</i>	V1-V9	PQ637121	100.0	0	2333.04
3-6_35	Sa <i>Bacillus velezensis</i>	V1-V9	NR_116240	99.8	0	2534.12
3-6_36	Sa <i>Bacillus paramycoides</i>	V1-V9	NR_157734	96.7	0	2348.37
3-6_37	Sa <i>Bacillus cereus</i>	V1-V9	PQ625838	99.96	0	2550.35
3-6_38	Sa <i>Bacillus sp.</i>	V1-V9	PQ522130	99.8	0	2502.56
3-6_39	Sa <i>Bacillus cereus</i>	V1-V9	PQ625838	99.9	0	2459.28
3-6_70	Sa <i>Bacillus tequilensis</i>	V1-V9	NR_104919	99.9	0	2540.43
3-6_71	Sa <i>Bacillus cereus</i>	V1-V9	PQ625838	99.9	0	2549.45
3-6_73	Sa <i>Bacillus cereus</i>	V1-V9	PQ625838	99.9	0	2524.2
3-6_74	Sa <i>Bacillus tequilensis</i>	V1-V9	NR_104919	99.9	0	2497.15
3-6_75	Sa <i>Bacillus spizizenii</i>	V1-V9	PQ609718	99.96	0	2553.95
3-6_76	Sa <i>Bacillus wiedmannii</i>	V1-V9	NR_152692	99.9	0	2446.65
3-6_77	Sa <i>Bacillus arachidis</i>	V1-V9	PQ344061	99.96	0	2559.36
3-6_79	Sa <i>Bacillus proteolyticus</i>	V1-V9	PQ608574	99.96	0	2519.69
3-6_80	Sa <i>Bacillus cereus</i>	V1-V9	PQ340309	99.8	0	2553.05
3-6_81	Sa <i>Bacillus velezensis</i>	V1-V9	PQ609703	99.96	0	2463.79
3-6_82	Sa <i>Bacillus subtilis</i>	V1-V9	PQ651427	99.9	0	2484.53
11-12_17	Sa <i>Methylobacterium radiotolerans</i>	V3-V4	NR_074244	99.4	4.10^{-135}	480.081
3-6_116	Sa <i>Bacillus velezensis</i>	V3-V4	NR_113800	100.0	0	778.538

ID	EA souche bactérienne	RA	Accession	PI [%]	EV	Bit-score
3-6_119	Sa <i>Ralstonia pickettii</i>	V3-V4	NR_114126	98.3	0	713.617
3-6_21	Sa <i>Bacillus wiedmannii</i>	V3-V4	NR_164882	100.0	0	776.735
11-12_1	Sc <i>Ralstonia pickettii</i>	V1-V9	MT827171	99.9	0	2491.74
11-12_2	Sc <i>Bacillus licheniformis</i>	V1-V9	PQ479274	99.8	0	2482.72
11-12_26	Sc <i>Ralstonia pickettii</i>	V1-V9	MT827171	99.9	0	2418.7
11-12_28	Sc <i>Ralstonia pickettii</i>	V1-V9	MT827171	99.9	0	2489.03
11-12_4	Sc <i>Ralstonia insidiosa</i>	V1-V9	NR_025242	99.7	0	2296.97
11-12_44	Sc <i>Ralstonia pickettii</i>	V1-V9	MT827171	99.9	0	2490.84
11-12_45	Sc <i>Microbacterium</i> sp.	V1-V9	PP768222	99.8	0	2121.15
11-12_46	Sc <i>Ralstonia pickettii</i>	V1-V9	MT827171	100.0	0	2498.95
11-12_47	Sc <i>Ralstonia insidiosa</i>	V1-V9	MK491069	100.0	0	2518.79
11-12_5	Sc <i>Pseudomonas coleopterorum</i>	V1-V9	NR_137215	99.7	0	2347.47
11-12_9	Sc <i>Kocuria rhizophila</i>	V1-V9	NR_026452	99.8	0	2428.62
3-6_10	Sc <i>Bacillus wiedmannii</i>	V1-V9	NR_152692	99.96	0	2487.23
3-6_100	Sc <i>Bacillus velezensis</i>	V1-V9	NR_116240	99.8	0	2515.18
3-6_101	Sc <i>Bacillus velezensis</i>	V1-V9	NR_116240	99.9	0	2526.0
3-6_102	Sc <i>Bacillus velezensis</i>	V1-V9	NR_116240	99.9	0	2512.48
3-6_12	Sc <i>Bacillus</i> sp.	V1-V9	KR077805	100.0	0	2551.25
3-6_13	Sc <i>Bacillus wiedmannii</i>	V1-V9	NR_152692	99.9	0	2551.25
3-6_14	Sc <i>Bacillus mycoides</i>	V1-V9	NR_113990	100.0	0	2513.38
3-6_141	Sc <i>Bacillus velezensis</i>	V1-V9	CP173038	99.96	0	2516.08
3-6_142	Sc <i>Bacillus</i> sp.	V1-V9	PQ121413	100.0	0	2526.0
3-6_143	Sc <i>Bacillus subtilis</i>	V1-V9	PQ651427	99.96	0	2458.38
3-6_144	Sc <i>Bacillus velezensis</i>	V1-V9	CP169520	99.96	0	2537.72
3-6_145	Sc <i>Bacillus</i> sp.	V1-V9	PQ522130	99.96	0	2514.28
3-6_146	Sc <i>Bacillus velezensis</i>	V1-V9	CP173038	99.96	0	2505.26
3-6_147	Sc <i>Bacillus</i> sp.	V1-V9	PQ522130	99.96	0	2514.28
3-6_148	Sc <i>Bacillus safensis</i>	V1-V9	PQ621869	99.96	0	2471.0
3-6_149	Sc <i>Bacillus velezensis</i>	V1-V9	PQ609703	99.96	0	2498.05
3-6_15	Sc <i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	V1-V9	ON045789	99.9	0	2512.48
3-6_150	Sc <i>Bacillus safensis</i>	V1-V9	NR_041794	99.8	0	2547.64
3-6_151	Sc <i>Bacillus velezensis</i>	V1-V9	CP173038	99.0	0	2434.03
3-6_153	Sc <i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	V1-V9	PQ163812	99.96	0	2507.07
3-6_2	Sc <i>Bacillus cereus</i>	V1-V9	PQ625838	99.9	0	2544.04
3-6_3	Sc <i>Bacillus tequilensis</i>	V1-V9	NR_104919	99.9	0	2382.63
3-6_5	Sc <i>Bacillus mycoides</i>	V1-V9	NR_113990	99.9	0	2498.05
3-6_55	Sc <i>Bacillus tequilensis</i>	V1-V9	NR_104919	99.9	0	2538.63
3-6_57	Sc <i>Bacillus velezensis</i>	V1-V9	NR_116240	99.9	0	2527.81
3-6_58	Sc <i>Bacillus foraminis</i>	V1-V9	JQ867498	99.9	0	2531.41
3-6_59	Sc <i>Bacillus mycoides</i>	V1-V9	NR_113990	100.0	0	2369.11
3-6_6	Sc <i>Bacillus wiedmannii</i>	V1-V9	NR_152692	99.96	0	2355.58
3-6_60	Sc <i>Bacillus</i> sp.	V1-V9	CP168124	99.9	0	2527.81
3-6_62	Sc <i>Bacillus</i> sp.	V1-V9	CP168124	99.96	0	2517.89
3-6_63	Sc <i>Bacillus velezensis</i>	V1-V9	NR_116240	99.9	0	2516.99
3-6_66	Sc <i>Bacillus wiedmannii</i>	V1-V9	NR_152692	99.7	0	2268.12

ID	EA souche bactérienne	RA	Accession	PI [%]	EV	Bit-score
3-6_67	Sc <i>Bacillus velezensis</i>	V1-V9	NR_116240	99.8	0	2509.77
3-6_68	Sc <i>Bacillus cereus</i>	V1-V9	PQ047533	100.0	0	2452.06
3-6_8	Sc <i>Bacillus tequilensis</i>	V1-V9	NR_104919	99.96	0	2507.07
3-6_9	Sc <i>Peribacillus frigiditolerans</i>	V1-V9	PQ344050	99.4	0	2512.48
3-6_91	Sc <i>Bacillus velezensis</i>	V1-V9	NR_116240	99.9	0	2495.35
3-6_92	Sc <i>Bacillus velezensis</i>	V1-V9	NR_116240	99.9	0	2525.1
3-6_94	Sc <i>Bacillus velezensis</i>	V1-V9	NR_116240	99.9	0	2500.76
3-6_95	Sc <i>Bacillus thuringiensis</i>	V1-V9	NR_114581	99.96	0	2528.71
3-6_97	Sc <i>Bacillus velezensis</i>	V1-V9	NR_116240	99.7	0	2434.03
3-6_98	Sc <i>Bacillus velezensis</i>	V1-V9	NR_075005	99.9	0	2438.54
3-6_99	Sc <i>Bacillus velezensis</i>	V1-V9	NR_116240	99.9	0	2489.94
7-9_176	Sc <i>Pseudomonas coleopterorum</i>	V1-V9	NR_137215	99.7	0	2416.9
11-12_7	Sc <i>Staphylococcus hominis</i>	V3-V4	NR_074244	99.4	4.10^{-135}	480.081
3-6_152	Sc <i>Bacillus subtilis</i>	V3-V4	NR_114126	98.3	0	713.617
3-6_121	Sf <i>Bacillus velezensis</i>	V1-V9	CP169520	99.96	0	2503.46
3-6_122	Sf <i>Bacillus velezensis</i>	V1-V9	NR_075005	99.8	0	2314.11
3-6_123	Sf <i>Bacillus velezensis</i>	V1-V9	NR_116240	99.9	0	2526.0
3-6_124	Sf <i>Rhodococcus cercidiphylli</i>	V1-V9	NR_116275	99.8	0	2303.29
3-6_127	Sf <i>Bacillus velezensis</i>	V1-V9	CP077106	99.8	0	2414.19
3-6_129	Sf <i>Bacillus velezensis</i>	V1-V9	NR_116240	99.9	0	2488.13
3-6_130	Sf <i>Bacillus velezensis</i>	V1-V9	NR_075005	99.8	0	2338.45
3-6_131	Sf <i>Bacillus tequilensis</i>	V1-V9	NR_104919	99.9	0	2330.34
3-6_132	Sf <i>Priestia aryabhattai</i>	V1-V9	NR_115953	99.96	0	2342.96
3-6_133	Sf <i>Bacillus velezensis</i>	V1-V9	CP077106	99.95	0	1897.53
3-6_134	Sf <i>Bacillus subtilis</i>	V1-V9	NR_113265	99.96	0	2301.48
3-6_135	Sf <i>Bacillus sp.</i>	V1-V9	PQ522130	99.96	0	2512.48
3-6_136	Sf <i>Bacillus velezensis</i>	V1-V9	PQ459610	99.96	0	2523.3
3-6_138	Sf <i>Bacillus subtilis</i>	V1-V9	PQ651427	99.96	0	2498.05
3-6_139	Sf <i>Bacillus velezensis</i>	V1-V9	CP173038	99.96	0	2505.26
3-6_179	Sf <i>Bacillus subtilis</i>	V1-V9	PQ608828	99.96	0	2566.58
3-6_180	Sf <i>Lysinibacillus fusiformis</i>	V1-V9	PP439366	100.0	0	2569.28
3-6_181	Sf <i>Bacillus tequilensis</i>	V1-V9	NR_104919	99.96	0	2460.18
3-6_182	Sf <i>Brevibacillus centrosporus</i>	V1-V9	NR_113768	99.6	0	2497.15
3-6_184	Sf <i>Bacillus spizizenii</i>	V1-V9	PQ600429	100.0	0	2567.48
3-6_185	Sf <i>Bacillus arachidis</i>	V1-V9	PQ344061	99.96	0	2557.56
3-6_186	Sf <i>Bacillus subtilis</i>	V1-V9	OQ504750	99.96	0	2568.38
3-6_187	Sf <i>Bacillus inaquosorum</i>	V1-V9	NR_104873	99.6	0	2137.38
3-6_40	Sf <i>Bacillus spizizenii</i>	V1-V9	PQ609718	99.96	0	2568.38
3-6_42	Sf <i>Bacillus proteolyticus</i>	V1-V9	NR_157735	99.96	0	2561.17
3-6_44	Sf <i>Bacillus spizizenii</i>	V1-V9	PQ609718	99.9	0	2565.68
3-6_45	Sf <i>Pseudomonas mosselii</i>	V1-V9	NR_024924	99.9	0	2456.57
3-6_46	Sf <i>Bacillus cereus</i>	V1-V9	PQ625838	99.96	0	2557.56
3-6_48	Sf <i>Bacillus thuringiensis</i>	V1-V9	PQ283825	99.96	0	2516.08
3-6_50	Sf <i>Bacillus spizizenii</i>	V1-V9	PQ600429	99.96	0	2512.48
3-6_51	Sf <i>Bacillus subtilis</i>	V1-V9	EU982528	99.96	0	2449.36

ID	EA	souche bactérienne	RA	Accession	PI [%]	EV	Bit-score
3-6_53	Sf	<i>Bacillus velezensis</i>	V1-V9	NR_116240	99.9	0	2437.64
3-6_54	Sf	<i>Bacillus tequilensis</i>	V1-V9	NR_104919	99.9	0	2498.05
3-6_83	Sf	<i>Bacillus arachidis</i>	V1-V9	PQ344061	99.96	0	2564.78
3-6_84	Sf	<i>Bacillus arachidis</i>	V1-V9	PQ344061	99.9	0	2562.97
3-6_86	Sf	<i>Bacillus tequilensis</i>	V1-V9	NR_104919	99.9	0	2538.63
3-6_87	Sf	<i>Bacillus tequilensis</i>	V1-V9	NR_104919	99.8	0	2490.84
3-6_88	Sf	<i>Bacillus tequilensis</i>	V1-V9	PQ302234	99.9	0	2515.18
3-6_89	Sf	<i>Bacillus tequilensis</i>	V1-V9	NR_104919	99.96	0	2499.85
3-6_90	Sf	<i>Bacillus wiedmannii</i>	V1-V9	NR_152692	99.96	0	2445.75
3-6_125	Sf	<i>Bacillus velezensis</i>	V3-V4	NR_114126	98.3	0	713.617
3-6_126	Sf	<i>Nocardioides baekrodamisoli</i>	V3-V4	NR_114126	98.3	0	713.617
3-6_43	Sf	<i>Bacillus wiedmannii</i>	V3-V4	NR_164882	100.0	0	776.735
3-6_128	Sf	<i>Streptomyces xiangtanensis</i>	V3-V4	NR_114126	98.3	0	713.617

Interaction entre les communautés endophytes du xylème et les bactéries phytopathogènes :
Le cas de *Brenneria salicis* et *Xylella fastidiosa* chez les Saules et Peupliers

Présenté par Félicien Timmermans

Le xylème des plantes, tissu essentiel au transport de l'eau et des nutriments, constitue un environnement unique abritant une diversité de microorganismes. Ces communautés microbiennes jouent un rôle clé dans la santé des plantes, mais leur équilibre peut être perturbé par des pathogènes spécialistes du xylème tels que *Xylella fastidiosa* et *Brenneria salicis*. Ces pathogènes, responsables de maladies graves, posent un défi majeur pour la protection des écosystèmes agricoles et naturels. Ils partagent des hôtes potentielles communes au sein de la famille de *Salicaceae* appartenant aux genre *Salix* et *Populus*. Ces arbres, largement répandus dans les régions tempérées, sont des modèles d'étude pertinents pour explorer les interactions complexes entre les communautés endophytes du xylème et les bactéries phytopathogènes.

Ce travail vise, d'une part, à caractériser la diversité microbienne du xylème par des approches culture-dépendantes et métagénomiques, et, d'autre part, à évaluer l'efficacité de certains endophytes à limiter la colonisation des pathogènes in vivo. Bien que certaines limitations techniques nécessitent des ajustements protocolaires, les résultats obtenus suggèrent que les endophytes sélectionnés ont des propriétés antagonistes contre *Xylella fastidiosa*, au sein de *Nicotiana tabacum* var. Xanthi en conditions contrôlées.

La diversité taxonomique des microbiotes xylémiens de *Salix* et *Populus* a révélé des variations significatives selon les espèces hôtes. Ces différences, confrontées à la littérature, mettent en lumière des spécificités propres à la famille des *Salicaceae* et des divergences notables avec d'autres microbiotes xylémiens, comme celui de l'olivier.

En conclusion, ce mémoire permet d'envisager des pistes d'améliorations des expériences réalisées et souligne le potentiel des endophytes comme agents de biocontrôle durable et met en avant l'importance d'approches intégratives pour répondre aux défis posés par les pathogènes du xylème. Ces résultats ouvrent des perspectives prometteuses pour protéger les cultures essentielles tout en favorisant une gestion écologique et durable des écosystèmes.