



ROYAUME DU MAROC
Université Mohammed V - Rabat
Faculté de Médecine et de Pharmacie

RABAT



Année 2021

N°: MM0332021

MEMOIRE DE MASTER

MASTER DE « **Biotechnologie Médicale** »

OPTION « **Biomédicale** »

Intitulé

Caractérisation et distribution du gène *ppaX*, impliqué dans la résistance à la salinité chez *Bacillus velezensis*

Soutenu par :

Ihsane HALOUM

Devant le jury, composé de :

Pr. AANNIZ Tarik, Faculté de Médecine et de Pharmacie de Rabat, Président

Pr. ALLAOUI Abdelmounaaim, Université Mohamed VI Polytechnique de Benguerir, Directeur de PFE

Pr. BISKRI Latefa, Université Mohamed VI Polytechnique de Benguerir, Encadrante

Dr. ALLAM Loubna, Faculté de Médecine et de Pharmacie de Rabat, Examinatrice

Mémoire de Projet de Fin d'Etudes

Master en Sciences

Spécialité :

Biotechnologie Médicale

Caractérisation et distribution du gène *ppaX*, impliqué dans la résistance à la salinité chez *Bacillus velezensis*

Réalisé et Soutenu, le **02 Octobre 2021**, par **Ihsane HALOUM**

N° : MM0332021

Membres du Jury

| | | |
|--------------------------|------|-------------------|
| Pr Tarik AANNIZ | FMPR | Président du jury |
| Dr Loubna ALLAM | FMPR | Examinatrice |
| Pr Abdelmounaaim ALLAoui | UM6P | Directeur du PFE |
| Pr Latefa BISKRI | UM6P | Encadrante |




Official stamp of the Faculty of Medicine and Pharmacy, Mohammed V University, Rabat, Morocco.



بِسْمِ اللَّهِ الرَّحْمَنِ الرَّحِيمِ

رَبِّ زَيْنَبِ عَالِمَا
وَفَاكِ

صَدِّقَ اللَّهِ الْعَظِيمِ



DEDICACES

*Tous les mots ne sauraient exprimer la Gratitude,
l'Amour, le Respect et la Reconnaissance
Je dédie ce Travail...*

À ma Très Chère Mère

À La Personne La Plus Chère A Mon Cœur ;

Toujours présente à mes côtés pour me soutenir, m'aider et m'encourager.

Mon immense gratitude et mon profond amour, à toi Maman

Puisse Dieu tout puissant vous procurer santé, bonheur et prospérité.

À tous mes Enseignants

Depuis ceux qui m'ont appris à écrire mon nom, en signe de vive
gratitude et de reconnaissance

*À ma Famille, Tous mes Amis et À tous ceux qui me
sont Chers et que J'ai omis de citer*

Merci pour votre amitié et vos encouragements. Que ce modeste travail soit le
témoignage de mon affection.

REMERCIEMENTS

A Professeur : Mr Azeddine IBRAHIMI

Directeur du Laboratoire des Biotechnologies Médicales à la
FMPR 'MedBiotech'

Permettez-nous de vous manifester notre admiration de vos qualités humaines et
professionnelles, votre dynamisme et sympathie.

A Professeur : Mme Mouna OUADGHIRI

Coordinatrice du Master Biotechnologies Médicales

C'est lors des modules que vous nous avez enseigné, Professeur, que nous avons pu
approfondir nos connaissances en Biologie Moléculaire et en Techniques de l'ADN
Recombinant.

A Professeur : Mr Tarik AANNIZ

Président du jury & Professeur de la Microbiologie et de la Biochimie

Nous vous présentons, Professeur, nos vifs remerciements d'avoir accepté de présider le jury
de soutenance. Sachez que le savoir que vous nous avez prodigué pendant ces deux années
nous a été d'une grande utilité pour comprendre, suivre et affiner notre PFE.

A Docteur Loubna ALLAM

Examinatrice de la soutenance & Enseignante de la Modélisation Moléculaire

Vous avez accepté de juger ce travail avec une spontanéité et une simplicité émouvante. Vous
êtes un très bon exemple à suivre par vos compétences et vos qualités morales.
Nous tenons à vous exprimer nos sincères remerciements et profond respect.

En Hommage à notre cher Professeur défunt Mr Driss OURAINI

Professeur de la Régulation Génique & de la génétique humaine

Les émotions nous envahissent, tellement tant de souvenirs nous ont liées à ce vénérable
monument de l'enseignement. Je dois témoigner de sa bonté et de sa générosité. Pr OURAINI
était une noble personne, un professeur infatigable. Il incarnait en sa personne la simplicité du
grand et la sagesse du maître.

Professeur OURAINI, était et restera dans la rétine de notre mémoire.

Reposez Cher Professeur en paix.

À mes Professeurs encadrants :

Mme Latefa BISKRI & Mr Abdelmounaaim ALLAOUI

Professeurs à l'UM6P & Responsables du CIPEM

C'est tout à notre honneur que vous soyez nos encadrants. Votre modestie, votre disponibilité, votre sens de partage, votre ouverture d'esprit et vos compétences sont un trésor.

Sachez chers professeurs que nous avons appris de vous le sens de la recherche, les clés du raisonnement, l'art de penser, nous vous en serons reconnaissante.

Vos conseils sont judicieux et Vos efforts sont fructueux.

Malgré vos multiples préoccupations, vous avez bien voulu nous confier ce travail et le diriger.

Nous avons beaucoup apprécié votre accompagnement.

À tous les chercheurs du centre de recherche de l'UM6P, et surtout du 'CIPEM'

Nous saluons en vous les grandes qualités techniques et humaines que nous avons eues l'occasion d'apprécier lors de notre passage dans votre équipe. Merci de nous avoir acceptés parmi vous.

À Monsieur le Doyen de la FSTM Pr. Mustapha LKHIDER

À Monsieur le Pr Adil DANI Responsable de l'observatoire de la vie des étudiants à la FSTM.

À Ma chère amie Mme Fatima Ezzahra LOUANJLI

À la Fondation Marocaine de l'Etudiant

Y compris tout le personnel, nos coachs, nos stuteurs, ...

Fière et honorée d'être ambassadrice de la FME.

Votre accompagnement et soutien, votre bienveillance et aide nous ont été très bénéfiques.

A travers cette dédicace, nous espérons vivement pouvoir exprimer notre plus profond respect, ainsi que notre vive reconnaissance

RESUME

Caractérisation et distribution du gène *ppaX*, impliqué dans la résistance à la salinité chez *Bacillus velezensis*

Face à la salinité, les rhizobactéries viennent au secours des plantes, en réduisant les effets néfastes de ce stress abiotique. En s'appuyant sur l'hypothèse que la résistance à la salinité est assurée par une protéine, ce mémoire a pour objectif d'étudier la distribution et la caractérisation du gène qui code cette protéine ; grâce au test de salinité effectué chez quatre souches de *Bacillus velezensis* issues de diverses niches écologiques, en mettant en pratique l'intérêt de la PCR pour amplifier ce gène, puis établir sa séquence et en concevant des modèles expérimentaux visant : (1) le clonage du gène *ppaX* et la vérification de sa capacité d'induire la résistance à la salinité chez *E.coli*, (2) la mutation du gène *ppaX* de *Bacillus velezensis* et la vérification à nouveau de sa résistance à la salinité ; (3) l'expression, la production et la purification des pyrophosphatases recombinantes et leurs anticorps correspondants ainsi que l'étude de leurs interactions protéiques. Les résultats obtenus suggèrent que ses souches ont toléré les faibles concentrations en NaCl qui ont induit leur croissance ; cependant ces bactéries ont résisté aux fortes concentrations en NaCl et s'y sont adaptées plus ou moins difficilement. Suite à la PCR, le gène *ppaX* a été révélé chez les quatre souches. Les alignements nucléotidique et peptidique ont permis de détecter une certaine « conservation » des séquences *ppaX* et *Ppsases* chez les différentes souches étudiées. En perspectives, ces résultats et modèles expérimentaux pourront être exploités dans l'étude fonctionnelle du gène *ppaX*.

Mots-clés : *Bacillus velezensis*, Biocontrôle, Halotolérance, PGPR, *ppaX*, Résistance, Salinité.

ABSTRACT

Characterization and distribution of the *ppaX* gene, involved in salinity resistance in *Bacillus velezensis*

In the face of salinity, rhizobacteria come to the rescue of plants by reducing the harmful effects of this abiotic stress. Based on the hypothesis that resistance to salinity is ensured by a protein, this thesis aims to study the distribution and characterization of the gene that encodes this protein; thanks to the salinity test carried out in four strains of *Bacillus velezensis* from various ecological niches, by putting into practice the interest of PCR to amplify this gene, then establishing its sequence and designing experimental models aiming at: (1) the cloning of the *ppaX* gene and the verification of its ability to induce salinity resistance in E.coli, (2) the mutation of the *ppaX* gene of *Bacillus velezensis* and the verification again of its salinity resistance; (3) the expression, production and purification of recombinant pyrophosphatases and their corresponding antibodies and the study of their protein interactions. The results obtained suggest that these strains tolerated the low NaCl concentrations that induced their growth; however, these bacteria resisted and adapted more or less difficult to high NaCl concentrations. Following PCR, the *ppaX* gene was revealed in all four strains. Nucleotide and peptide alignments allowed to detect a certain "conservation" of the *ppaX* and *Ppases* sequences in the different strains studied. In the future, these results and experimental models could be used to study the function of the *ppaX* gene.

Keywords: *Bacillus velezensis*, Biocontrol, Halotolerance, PGPR, *ppaX*, Resistance, Salinity.

ملخص

توصيف و توزيع الجين *ppaX* المساهم في مقاومة الملوحة عند *Bacillus velezensis*

تساعد البكتيريا الجدرية النباتات في مواجهة الملوحة، إذ تخفف من الأضرار البالغة التي قد يسببها هذا الإجهاد اللاحيوي للنباتات. وبناء على فرضية وجود بروتين مسؤول عن مقاومة الملوحة، تهدف هذه الأطروحة إلى دراسة توزيع وتوصيف الجين *ppaX* الذي يشفر هذا البروتين، وذلك عن طريق اختبار الملوحة الذي تم إجراؤه لدى أربع سلالات بكتيرية ل *Bacillus velezensis* المنحدرة من مصادر بيئية مختلفة. ثم اختبار PCR لتضخيم جين *ppaX* وتحديد تسلسله الجيني وتصميم نماذج تجريبية قصد: (1) استنساخ الجين *ppaX* والتحقق من قدرته على إحداث مقاومة *Escherichia coli* للملوحة، (2) تحوير جين *ppaX* عند *Bacillus velezensis* ومراقبة مقاومته للملوحة، (3) تعبير *Ppase* المؤتلف وإنتاجه وتنقيته مع إنتاج الأجسام المضادة المقابلة له، بغية دراسة تفاعلاته البروتينية. تشير النتائج التي تم الحصول عليها إلى أن سلالات *Bacillus velezensis* تحملت تركيزات منخفضة من NaCl مما أدى إلى نموها. لكنها، قاومت وتكيفت مع التركيزات العالية من NaCl. باستعمال تقنية PCR، تم الكشف عن جين *ppaX* لدى جميع السلالات. مكنت محاذاة النوكليوتيدات والبيتيدات من الكشف عن حفظ جزئي للتسلسل الجيني ل *ppaX* و الأميني ل *Ppase*. في المستقبل، يمكن استخدام هذه النتائج والنماذج التجريبية في الدراسة الوظيفية للجين *ppaX*.

الكلمات المفتاحية: *Bacillus velezensis*, PGPR, *ppaX*, الإجهاد اللاحيائي، مقاومة الملوحة.

AVANT-PROPOS

Ce travail s'inscrit dans le cadre de mon projet de fin d'études, effectué pendant 7 mois (Janvier-Juillet), *in silico* et *in vitro*, au niveau du **CIPEM**, à l'**UM6P** et visant l'étude de la distribution et la caractérisation du gène *ppaX*, impliqué dans la résistance à la salinité chez *Bacillus velezensis*. Afin de répondre à cet objectif, différents tests phénotypiques et génotypiques ont été réalisés sur ces bactéries.

Présentation de l'organisme d'accueil : CIPEM- UM6P

Le CIPEM : Centre de coalition, innovation et prévention des épidémies au Maroc : est un centre de recherche et de développement dont la mission est d'accélérer l'utilisation et le développement de nouveaux médicaments et de nouveaux vaccins contre les maladies infectieuses émergentes et d'anticiper leur apparition. Le centre englobe l'ensemble des thématiques de la microbiologie incluant la virologie, la bactériologie, la parasitologie et la mycologie.



Figure 1: Organigramme du CIPEM

l'UM6P, Université Polytechnique Mohammed VI est une institution dédiée à la recherche et à l'innovation en Afrique, située dans la commune de Benguerir, en plein cœur de la Ville Verte, qui vise à se positionner parmi les universités de renommée mondiale. Engagée dans le développement économique et humain et place la recherche et l'innovation à l'avant-garde du développement africain, l'université est dotée d'un centre de recherche, regroupant plusieurs entités : centre de recherche sur les sols et fertilisants en Afrique, chemical and biochemical sciences, green process engineering, complex system engineering and human systems, ...

SOMMAIRE

| | |
|---|-----|
| LISTE DES ABREVIATIONS | I |
| LISTE DES TABLEAUX | III |
| LISTE DES FIGURES | IV |
| GLOSSAIRE | VI |
| I. INTRODUCTION GENERALE | 2 |
| II. ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE | 6 |
| II.1. <i>Bacillus velezensis</i> | 6 |
| II.1.1. Présentation de <i>Bacillus velezensis</i> | 6 |
| II.1.2. Propriétés biochimiques de <i>B. velezensis</i> : | 6 |
| II.1.3. Molécules bioactives synthétisées par <i>B.velezensis</i> | 6 |
| II.1.4. Environnements et niches de <i>Bacillus spp.</i> | 8 |
| II.2. Rhizobactéries favorisant la croissance des plantes | 9 |
| II.2.1. Commercialisation des PGPRs | 10 |
| II.3. Salinité : une menace de l'agriculture et de la santé publique..... | 11 |
| II.3.1. Salinité : une problématique de l'agriculture | 11 |
| II.3.2. Salinité : une problématique de santé publique | 12 |
| II.3.3. Bactéries et résistance à la salinité | 12 |
| III. MATERIELS & METHODES | 15 |
| III.1. Souches bactériennes et niches écologiques..... | 15 |
| III.2. Milieux et conditions de culture | 15 |
| III.2.1. Préparation du TSB medium | 15 |
| III.2.2. Préparation du TSA medium | 16 |
| III.3. Cryoconservation des souches : | 16 |
| III.4. Criblage des souches résistantes à la salinité..... | 17 |
| III.4.1. Milieu solide..... | 17 |
| III.4.2. Milieu liquide | 17 |
| III.5. Extraction du génome bactérien : | 18 |
| III.5.1. Protocole de l'extraction..... | 18 |
| III.5.2. Contrôle qualité de l'extraction génomique par électrophorèse : | 18 |
| III.6. Amplification par PCR (Polymerase Chain Reaction) | 19 |
| III.6.1. Programmes des PCRs | 21 |
| III.7. Séquençage sanger..... | 22 |
| III.8. Contrôle qualité, Correction et Alignement des séquences nucléotidiques des produits du séquençage | 23 |
| III.9. Traduction des produits de séquençage et Alignement protéique | 23 |
| III.10. Extraction plasmidique | 24 |
| III.11. Choix des enzymes de restriction & Digestion enzymatique | 27 |

| | | |
|-----------|--|-----|
| III.12. | Purification de l'ADN à partir du gel | 28 |
| III.13. | Ligation des inserts avec les vecteurs digérés : expérience préliminaire de clonage | 29 |
| III.14. | Transfert génétique chez <i>E.coli DH5α</i> | 29 |
| III.14.1. | <i>Préparation de cellules E.coli DH5α</i> chimio-compétentes | 29 |
| III.14.2. | Transformation de <i>E.coli DH5α</i> | 30 |
| III.15. | Transformation de <i>Bacillus velezensis</i> | 30 |
| III.15.1. | <i>Préparation des Bacillus velezensis QA2</i> compétentes | 30 |
| III.15.2. | Transformation des cellules compétentes de <i>Bacillus velezensis QA2</i> par le <i>pUC19</i> | 30 |
| III.16. | Workflow de l'étude..... | 31 |
| IV. | RESULTATS | 36 |
| IV.1. | Culture bactérienne..... | 36 |
| IV.2. | Criblage des souches résistantes à la salinité..... | 36 |
| IV.2.1. | Milieu solide :..... | 36 |
| IV.2.2. | Milieu liquide : | 37 |
| IV.3. | Extraction du génome bactérien | 44 |
| IV.4. | Amplification par PCR (Polymerase Chain Reaction) | 44 |
| IV.5. | Séquençage sanger et Alignement des séquences nucléotidiques des produits du séquençage | 45 |
| IV.6. | Traduction des produits de séquençage et Alignement protéique | 47 |
| IV.7. | Extraction plasmidique | 48 |
| IV.8. | Digestion enzymatique | 48 |
| IV.9. | Ligation et tentative de clonage..... | 49 |
| IV.10. | Transformation de <i>E.coli DH5α</i> et Calcul de l'efficacité de transformation..... | 52 |
| IV.11. | Transformation de <i>Bacillus velezensis QA2</i> par le <i>pUC19</i> et Calcul de l'efficacité de transformation | 53 |
| V. | DISCUSSION..... | 55 |
| V. | CONCLUSION ET PERSPECTIVES | 58 |
| VI. | REFERENCES..... | 61 |
| VII. | ANNEXES | ii |
| VII.1. | Alignement des séquences peptidiques des Ppases | ii |
| VII.2. | Composition des milieux de culture | iii |
| VII.2.1. | TSB medium..... | iii |
| VII.2.2. | TSA medium | iv |
| VII.3. | Préparation des milieux TSA et TSB à différentes concentrations de NaCl | iv |
| VII.4. | Résultats du test de salinité en milieu liquide..... | iv |
| VII.5. | Protocole de l'extraction du génome bactérien | vii |
| VII.1. | Produits de PCR du gène <i>ppaX</i> | vii |
| VII.1. | Alignement des séquences nucléotidiques des <i>produits de séquençage</i> | xii |
| VII.2. | Alignement des séquences protéiques des <i>PpaX</i> après traduction des <i>ORFs</i> | xiv |

LISTE DES ABREVIATIONS

% : Pourcent

µl : microlitre

AA : Acide aminé

ADN : Acide DésoxyriboNucléique

AN : Acide Nucléique

Ap : Ampicilline

ARN : Acide RiboNucléique

AVC : accidents vasculaires cérébraux

BET : Bromure d'Ethidium

BV: *Bacillus velezensis*

C : degré celcius

CaCl₂: Chlorure de Calcium

c-à-d : c'est à dire

CIPEM : Centre de Coalition, Innovation et Prévention des Epidémies au Maroc

CL : Collection du Laboratoire

DMSO : Diméthylsulfoxyde

DO : Densité Optique

FOR : Forward

g : Accélération

g : gramme

GST : Glutathione S-Transferase

H : heure

H⁺ : Proton

H₂O : Eau

Hist : Histidine

K⁺ : Potassium

KCl: Chlorure de Potassium

M : Molaire

mg : milligramme

Min : minute

ml : millilitre

mM : milliMolaire

Na⁺ : Sodium

NaCl : Chlorure de Sodium
ORF : open reading frame
pb: paire de base
PCR : Polymerase Chain Reaction
PGPR: Plant Growth Promoting Rhizobacterias
PM: Poids moléculaire
PPi: Pyrophosphate inorganique
REV : Reverse
ROS : Reactive Oxygene species
RPM : Revolutions Per Minute of rotor
Sec: seconde
TAE : Tris, Acétate, EDTA
T_m : température de fusion
TSA : Trypto-caséine soja agar
TSB : Trypso
UM6P : Université Mohamed 6 Polytechnique
UV : ultrat-violets
Vtt : Volume total

LISTE DES TABLEAUX

| | |
|---|----|
| Tableau 1: Description des souches bactériennes utilisées dans notre étude | 15 |
| Tableau 2: Liste des oligonucléotides utilisés spécifiquement dans notre étude..... | 20 |
| Tableau 3:Récapitulatif du protocole pour la réalisation de la PCR | 20 |
| Tableau 4: Description des plasmides utilisés dans les constructions de clonage..... | 24 |
| Tableau 5: Récapitulatif des inserts, des amorces, des vecteurs et des enzymes de restriction employées dans cette étude | 27 |
| Tableau 6: Récapitulatif du protocole de la double digestion enzymatique | 28 |
| Tableau 7: Préparation des milieux de culture à différentes concentrations de NaCl pour le test de salinité | iv |
| Tableau 8: Moyennes des triplicatas de DO600 mesurées pour DH5 α , en milieu liquide, à différentes concentrations (0,3,5,8,12, 15)% de NaCl, pendant 24 heures..... | v |
| Tableau 9: Moyennes des triplicatas de DO600 mesurées pour QA1, en milieu liquide, à différentes concentrations (0,3,5,8,12, 15)% de NaCl, pendant 24 heures..... | v |
| Tableau 10: Moyennes des triplicatas de DO600 mesurées pour QA2, en milieu liquide, à différentes concentrations (0,3,5,8,12, 15)% de NaCl, pendant 24 heures..... | v |
| Tableau 11: Moyennes des triplicatas de DO600 mesurées pour Z16, en milieu liquide, à différentes concentrations (0,3,5,8,12, 15)% de NaCl, pendant 24 heures..... | v |
| Tableau 12: Moyennes des triplicatas de DO600 mesurées pour DN59, en milieu liquide, à différentes concentrations (0,3,5,8,12, 15)% de NaCl, pendant 24 heures..... | v |
| Tableau 13: Moyennes des triplicatas de DO600 mesurées pour DN74, en milieu liquide, à différentes concentrations (0,3,5,8,12, 15)% de NaCl, pendant 24 heures..... | v |
| Tableau 14: Ecart-types des triplicatas de DO600 mesurées pour DH5 α , en milieu liquide, à différentes concentrations (0,3,5,8,12, 15)% de NaCl, pendant 24 heures..... | vi |
| Tableau 15: Ecart-types des triplicatas de DO600 mesurées pour QA1, en milieu liquide, à différentes concentrations (0,3,5,8,12, 15)% de NaCl, pendant 24 heures..... | vi |
| Tableau 16: Ecart-types des triplicatas de DO600 mesurées pour QA2, en milieu liquide, à différentes concentrations (0,3,5,8,12, 15)% de NaCl, pendant 24 heures..... | vi |
| Tableau 17: Ecart-types des triplicatas de DO600 mesurées pour Z16, en milieu liquide, à différentes concentrations (0,3,5,8,12, 15)% de NaCl, pendant 24 heures..... | vi |
| Tableau 18: Ecart-types des triplicatas de DO600 mesurées pour DN59, en milieu liquide, à différentes concentrations (0,3,5,8,12, 15)% de NaCl, pendant 24 heures..... | vi |
| Tableau 19: Ecart-types des triplicatas de DO600 mesurées pour DN74, en milieu liquide, à différentes concentrations (0,3,5,8,12, 15)% de NaCl, pendant 24 heures..... | vi |

LISTE DES FIGURES

| | |
|--|----|
| Figure 1: Organigramme du CIPEM | g |
| Figure 2: Structure moléculaire des composés ribosomaux et non ribosomaux synthétisés par <i>B.velezensis</i> | 7 |
| Figure 3: Schéma général illustrant la résistance systémique induite par les PGPR et ses voies de signalisation | 10 |
| Figure 4: Incubateur à sec innova 43, incubator shaker series, New Brunswick, employé dans l'incubation bactérienne | 16 |
| Figure 5: Etuve VWR, INCU-Line, E-INC56-002, employée dans l'incubation bactérienne | 16 |
| Figure 6: Cryotubes étiquetés..... | 17 |
| Figure 7: Spectrophotomètre UV-6300PC- Double beam spectrophotometer, utilisé dans la mesure de la DO .. | 17 |
| Figure 8: Lecteur des microplaques multimode, victor nivo, E-VICTOR-001, utilisé dans la mesure de la DO, pour le test de salinité sur milieu liquide..... | 18 |
| Figure 9: Cuve d'électrophorèse..... | 18 |
| Figure 10: Transilluminator VWR, E-GELDOC-001, smart 3, servant à la visualisation du gel d'électrophorèse sous UV..... | 19 |
| Figure 11: Visualisation de la séquence nucléotidique du gène <i>ppaX</i> de <i>Bacillus velezensis</i> CBMB205, NCBI, GenBank | 19 |
| Figure 12: Thermocycleur VWR, E-THERMC-001, Doppio, utilisée pour la PCR | 21 |
| Figure 13: Programme de la PCR ' <i>ppax</i> IHSANE HM 58' | 21 |
| Figure 14: Programme de PCR ' <i>ppax</i> IHSANE HM 48' | 22 |
| Figure 15: Nanodrope VWR, mySPEC, E-MYSPEC-001, utilisé pour le dosage des AN..... | 22 |
| Figure 16: Carte de restriction du plasmide pUC19..... | 25 |
| Figure 17: Carte de restriction du plasmide pSW23T | 25 |
| Figure 18: Carte de restriction du plasmide pGEX-4T-2 | 26 |
| Figure 19: Enzymes employées dans la digestion enzymatique et leurs sites de restriction | 27 |
| Figure 20: Matériels et précautions indispensables lors de la purification de l'ADN | 29 |
| Figure 21: Plan de la partie expérimentale | 31 |
| Figure 22: Stratégie de la construction d'une souche BV mutée du gène <i>ppaX</i> | 32 |
| Figure 23: Stratégie de la 3ème construction de clonage | 33 |
| Figure 24: Stratégie de la 4ème construction de clonage | 33 |
| Figure 25: Aspects des colonies des différentes souches bactériennes cultivées | 36 |
| Figure 26 : Résultats du test de salinité sur milieu solide | 37 |
| Figure 27: Courbes de croissance de la souche bactérienne <i>E.coli</i> DH5 α sur milieux TSB à différentes concentrations de NaCl | 38 |
| Figure 28: Courbes de croissance de la souche bactérienne QA1 sur milieux TSB à différentes concentrations de NaCl | 39 |
| Figure 29: Courbes de croissance de la souche bactérienne QA2 sur milieux TSB à différentes concentrations de NaCl..... | 40 |
| Figure 30: Courbes de croissance de la souche bactérienne Z16 sur milieux TSB à différentes concentrations de NaCl..... | 41 |
| Figure 31: Courbes de croissance de la souche bactérienne DN59 dans le milieu TSB à différentes concentrations de NaCl | 42 |
| Figure 32: Courbes de croissance de la souche bactérienne DN74 sur milieux TSB à différentes concentrations de NaCl | 43 |
| Figure 33: Electrophorèse sur gel d'agarose 0.7% de 5 microlitres/ 50 microlitres du volume total d'ADN génomique des 5 souches bactériennes <i>Bacillus</i> (QA1, QA2, Z16, DN59, DN74) | 44 |
| Figure 34: Electrophorèse de 3 microlitres / 25 microlitres du volume total des produits de PCR du gène <i>ppaX</i> des 5 souches bactériennes de <i>Bacillus</i> sur un gel d'agarose 0.7%..... | 44 |
| Figure 35: Alignement des séquences du gène <i>ppaX</i> des quatre souches de <i>B. velezensis</i> (QA2, Z16, DN59 et DN74) | 46 |

| | |
|--|------|
| Figure 36: Alignement des séquences protéiques PPase codée par l'ORF pSR8 et celles des souches de B.subtilis, B.velezensis, QA2, Z16 et DN59 par ClustalW de BioEdit..... | 47 |
| Figure 37: Contrôle qualité de l'extraction plasmidique du pUC19 et du pGEX4T2 par électrophorèse sur gel d'agarose (0,7%) en déposant 3 microlitres sur 50 microlitres des plasmides extraits dans chaque puit..... | 48 |
| Figure 38: Contrôle qualité des doubles digestions enzymatiques par gel d'électrophorèse 0.7% | 49 |
| Figure 39: Carte de restriction du plasmide recombinant, construit in-silico : pUC19::ppaxWTR | 50 |
| Figure 40: Carte de restriction du plasmide recombinant, construit in silico : pSW23T::ppax interne..... | 51 |
| Figure 41: Carte de restriction du plasmide recombinant, construit in silico : pGEX-4T-2:: ppax (GST-PpaX) . | 51 |
| Figure 42: Carte de restriction du plasmide recombinant, construit : pUC19:: ppaxHIST | 52 |
| Figure 43: Résultat de la transformation de DH5 α :: pUC19, sur milieu TSA additionné d'ampicilline..... | 53 |
| Figure 44: Résultat de la transformation de QA2:: pUC19, sur milieu TSA additionné d'ampicilline..... | 54 |
| Figure 45: Alignement des séquences protéiques Ppase codées par l'ORF pSR8 et celles des souches de B.subtilis, B.velezensis, par ClustalW de BioEdit | ii |
| Figure 46: Alignement des séquences protéiques PPase codées par l'ORF pSR8 et celles des souches de B.subtilis, B.velezensis, par Clustal Omega..... | ii |
| Figure 47: Alignement des séquences protéiques PPase codée par l'ORF pSR8 et celles des souches de B.subtilis, B.velezensis par Espresso, TCoffee..... | iii |
| Figure 48: Photo du stock préparé de boîtes de pétri -TSA Medium-..... | iv |
| Figure 49: Carte de restriction du produit PCR du gène entier <i>ppaX</i> amplifié par les amorces <i>ppaxF</i> et <i>ppaxRWT</i> | vii |
| Figure 50: Séquence nucléotidique du produit PCR du gène entier <i>ppaX</i> amplifié par les amorces <i>ppaxF</i> et <i>ppaxRWT</i> | viii |
| Figure 51: Carte de restriction du produit de PCR du fragment interne du gène <i>ppaX</i> amplifié par les amorces <i>ppaxFI</i> et <i>ppaxRI</i> | ix |
| Figure 52: Séquence nucléotidique du produit PCR du gène interne <i>ppaX</i> amplifié par les amorces <i>ppaxFI</i> et <i>ppaxRI</i> , d'une taille totale de 208-pb..... | ix |
| Figure 53: Carte de restriction du produit de PCR du gène entier <i>ppaX</i> amplifié par les amorces <i>ppaxGSTF</i> et <i>ppaxGSTR</i> (731-pb)..... | ix |
| Figure 54: Séquence nucléotidique du produit PCR du gène entier <i>ppaX</i> amplifié par les amorces <i>ppaxGSTF</i> et <i>ppaxGSTR</i> (731-pb)..... | x |
| Figure 55: Carte de restriction du produit de PCR du gène entier <i>ppaX</i> amplifié par les amorces <i>ppaxF</i> et <i>ppax HISTR</i> (758-pb) | xi |
| Figure 56: Séquence nucléotidique du produit de PCR du gène entier <i>ppaX</i> amplifié par les amorces <i>ppaxF</i> et <i>ppax HISTR</i> (758-pb) | xi |
| Figure 57: Alignement des séquences du gène <i>ppaX</i> des quatre souches de B. velezensis (QA2, Z16, DN59 et DN74) par Cluster Omega Multiple Alignment..... | xii |
| Figure 58: Alignement des séquences du gène <i>ppaX</i> des quatre souches de B. velezensis (QA2, Z16, DN59 et DN74) par TCoffee | xiii |
| Figure 59: Alignement des séquences protéiques PPase codée par l'ORF pSR8 et celles des souches de B. subtilis, B. velezensis, QA2, Z16 et DN59 par Clustal Omega..... | xiv |
| Figure 60: Alignement des séquences protéiques PPase codée par l'ORF pSR8 et celles des souches de B.subtilis, B.velezensis, QA2, Z16 et DN59 par Espresso, TCoffee | xv |

GLOSSAIRE

Allochtones : espèces qui transitent occasionnellement par la cavité buccale sans s'y établir de façon durable ; elles appartiennent à la flore de passage.

Extrémophile : organismes ayant la capacité de se développer et de se multiplier aux limites extrêmes de la vie, dans des conditions mortelles pour la plupart des autres organismes.

Intégrons : un système de capture et d'expression de gènes sous forme de cassettes.

Quorum sensing (QS) : mode de communication et de perception utilisé par les bactéries. Il se fonde sur la production de petites molécules, les auto-inducteurs (AI), qui peuvent diffuser à travers la membrane ou être transportés à l'extérieur de la cellule

Rhizosphère: représente la zone de 1 à 3mm, entourant les racines et les exsudats .

Thermophile : organismes ayant besoin d'une température élevée pour vivre.

Zymographie: ou zymogramme électrophorétique : est une technique qui permet la détection et la mesure de l'activité enzymatique.

INTRODUCTION GENERALE

I. INTRODUCTION GENERALE

Le sel est essentiel à la vie humaine et aux plantes. Mais, il est toxique à une concentration élevée aussi bien pour les plantes que pour l'Homme. Il endommage les mécanismes de photosynthèse, retarde la croissance végétale, appauvrit le sol en nutriments, provoque une synthèse accrue des ROS, entravant ainsi la productivité agricole (Arif et al., 2020; Isayenkov & Maathuis, 2019; Mahdi et al., 2020). Chez l'homme, la salinité intestinale et fécale est associée à la modification du microbiote intestinal, induisant une inflammation intestinale et des réactions auto-immunes ; provoquant ainsi différentes maladies, notamment le syndrome métabolique, l'obésité, le cancer de l'estomac, le dysfonctionnement rénal, l'hypertension et les maladies cardiovasculaires (Mm et al., 2017; Perry & Beevers, 1992; Y et al., 2015). Le sel affecte également le microbiome de la rhizosphère et la végétation entraînant une augmentation progressive de la salinité et de la désertification des sols (Pitzschke, 2016) ; une pression de sélection est donc appliquée à la faveur des microorganismes et des végétaux extrêmophiles (Mahdi et al., 2020; Pitzschke, 2016).

Les rhizobactéries sont les bactéries qui colonisent les racines. Certaines sont dotées d'un potentiel de biocontrôle, tolèrent la salinité et ont la capacité de synthétiser des solutés compatibles et des hormones indispensables à la croissance végétale (Abbas et al., 2019). L'exploitation des propriétés des rhizobactéries favorisant la croissance des plantes (PGPR) serait une solution biologique, écologique, simple et peu coûteuse ; visant à améliorer la croissance des plantes.

Bacillus velezensis est une bactérie qui a été isolée pour la première fois à partir de l'embouchure de la rivière Vélez, à Torredelmar, dans la province de Malaga, en Espagne (Ruiz-García et al., 2005). Cette espèce se trouve également dans différentes niches écologiques telles que le sol, l'eau, les produits fermentés ainsi que les intestins. En 2018, une souche de *Bacillus velezensis* QA2 a été isolée de la rhizosphère du quinoa, au laboratoire de microbiologie de l'UM6P (résultats non publiés). Cette souche a été caractérisée par sa capacité à doter la plante du quinoa d'une résistance à la salinité de l'ordre de 400mM. Cette bactérie a toléré des concentrations supérieures à 5% de NaCl. Un an plus tard, d'autres espèces de *Bacillus velezensis* ont été isolées dans ce laboratoire : QA2, ZI6, DN59, DN74, à partir de différents environnements (voir la partie III.1).

Une étude métagénomique du microbiome d'échantillons de saumure et de rhizosphère de l'halophyte '*Arthrocnemum macrostachyum*' (Mirete et al., 2015) a montré que le gène codant une pompe à protons, la pyrophosphatase liée à la membrane (H^+ -PPase) confère à *E.coli* osmosensible, une résistance au sel. Cette protéine induirait une résistance chez les cellules contre divers stress abiotiques, tels que le froid, la sécheresse, le NaCl et les métaux ; probablement parce que l'enzyme génère un potentiel membranaire en utilisant le PPi (Tsai et al., 2014; Yoon et al., 2013).

Les pyrophosphatases liées à la membrane peuvent nécessiter le Na^+ pour leur activité et catalyser le transport du Na^+ à l'extérieur de la cellule, comme pour les PPases de deux bactéries : l'hyperthermophile *Thermotoga maritima* et de la thermophile modérée *Moorella thermoacetica* (Malinen et al., 2007). Plus récemment, une pyrophosphatase membranaire intégrale, sous-famille, a été décrite dans diverses espèces bactériennes capables de transporter à la fois le Na^+ et le H^+ en dehors des bactéries et qui a peut-être évolué à partir de Na^+ -PPases (Luoto et al., 2013). Ainsi, la pyrophosphatase identifiée dans cette étude, peut jouer un rôle important dans l'adaptation des cellules bactériennes à une teneur accrue en sel (Baykov et al., 2013). La présente étude a pour but de vérifier si les souches *Bacillus velezensis* issues de différentes niches écologiques possédaient aussi le gène qui code la pyrophosphatase. Au préalable, il y a eu comparaison des séquences protéiques de : la PPase codée par l'ORF pSR8 (ref : Q9KCG7.1) (Mirete et al., 2015), la PPase de *Bacillus subtilis* dont les séquences sont publiées dans NCBI (ref : KOS73456.1) et la PPase de *Bacillus velezensis* (ref : KFI14974.1), en utilisant 3 programmes : Clustal Omega (Sievers & Higgins, 2014), BioEdit (Sanchez-Villeda et al., 2008) et Toffee Expresso (Armougom et al., 2006).

Les résultats de l'alignement protéiques des Ppases (**Figure 45**, **Figure 46** et **Figure 47**, en ANNEXES VII.1) ont montré que la partie de la protéine qui code la résistance à la salinité, ORF pSR8 (Mirete et al., 2015), a une longueur de 142 acides aminés et est donc plus courte que les séquences Ppases de *B.subtilis* et *B.velezensis*. Cette protéine semble être suffisante pour induire la résistance à la salinité dans *E. coli* osmosensible. D'où, l'hypothèse qu'un gène *ppaX*, codant la PPase serait aussi impliqué dans la résistance de *Bacillus velezensis* à la salinité, seul ou avec le concours d'autres gènes. Le but de ce travail est donc, d'étudier la distribution et la caractérisation du gène *ppaX* chez *B. velezensis*.

La présente étude a pour objectifs :

- D'étudier la résistance de quatre souches de *B. velezensis* à différentes concentrations de NaCl,
- De déterminer la distribution et la caractérisation du gène *ppaX* chez ces bactéries,
- De cloner le gène *ppaX*, codant la pyrophosphatase et vérifier s'il était capable de conférer à *E.coli* une résistance à la salinité.
- De réaliser des modèles expérimentaux à suivre pour muter le gène *ppaX* de *B. velezensis* et pour exprimer les protéines recombinantes *PpaX* fusionnée soit à la *GST* soit à un motif de six histidines.

ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE

II. ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE

II.1. *Bacillus velezensis*

II.1.1. Présentation de *Bacillus velezensis*

Bacillus velezensis est une bactérie aérobie, à Gram positif, formant des endospores (Rabbee et al., 2019), appartenant au phylum des « Firmicutes », à la classe des « Bacilli », de l'ordre des « caryophanales », à la Famille des « Bacillaceae » et au genre « Bacillus » (Reimer et al., 2019). Les tests phénotypiques et les analyses phylogénétiques ont indiqué que ces souches sont des membres du genre *Bacillus* et étroitement liées à *B. subtilis* et *B. amyloliquefaciens*. D'autres expériences d'hybridation ADN-ADN ont révélé que les nouvelles souches possèdent moins de 20% de similarité avec d'autres espèces de *Bacillus* et représentent donc une espèce distincte (Rabbee et al., 2019). Selon l'analyse phylogénétique, les espèces de *Bacillus* synonymes de *B. velezensis* se regroupent en clades constitués de *B. amyloliquefaciens*, *B. amyloliquefaciens* subsp. *Plantarum* et *B. methylotrophicus* (Rabbee et al., 2019).

II.1.2. Propriétés biochimiques de *B. velezensis* :

Nombreuses sont les études qui ont montré que *B. velezensis* est capable de synthétiser des métabolites secondaires, tels que : les lipopeptides cycliques (surfactin, bacillomycin-D, fengycin, et bacillibactin), ainsi que les polyketides (macrolactin, bacillaene et difficidin), impliqués dans la croissance des plantes, l'induction de leur résistance et la suppression des phytopathogènes et des microorganismes délétères (Rabbee et al., 2019). *B. velezensis* est considérée comme une usine cellulaire microbienne produisant une variété de métabolites secondaires, actifs et biologiques.

II.1.3. Molécules bioactives synthétisées par *B. velezensis*

En 2007, *B. amyloliquefaciens* FZB42 a été répertoriée comme la première bactérie biocontrôle, à Gram positif, dont le génome total a été séquencé (Chen et al., 2007; Rabbee et al., 2019), regroupant ainsi, 9 clusters de gènes spécialisés dans la production d'un large spectre de molécules bioactives, les métabolites secondaires (Figure 3), par le biais des modularly organized mega-enzymes: les non-ribosomal peptide synthétases et les polyketide synthases. Cinq de ces gènes (*srf*, *bmy*, *fen*, *nrs*, and *dhb*; 137 kb) sont impliqués dans la synthèse des lipopeptides cycliques

(surfactin, bacillomycin-D, fengycin, peptide inconnu et the iron-siderophore bacillibactin), les 3 autres clusters (*mln*, *bae* et *dfn*; 199 kb) sont responsables de la formation des polyketides antibactériens (macrolactin, bacillaene et difficidin), cependant, le neuvième gène (*bac*; 6.9 kb) est impliqué dans la synthèse et l'exportation de "l'antibacterial dipeptide bacilysin" (Rabbee et al., 2019).

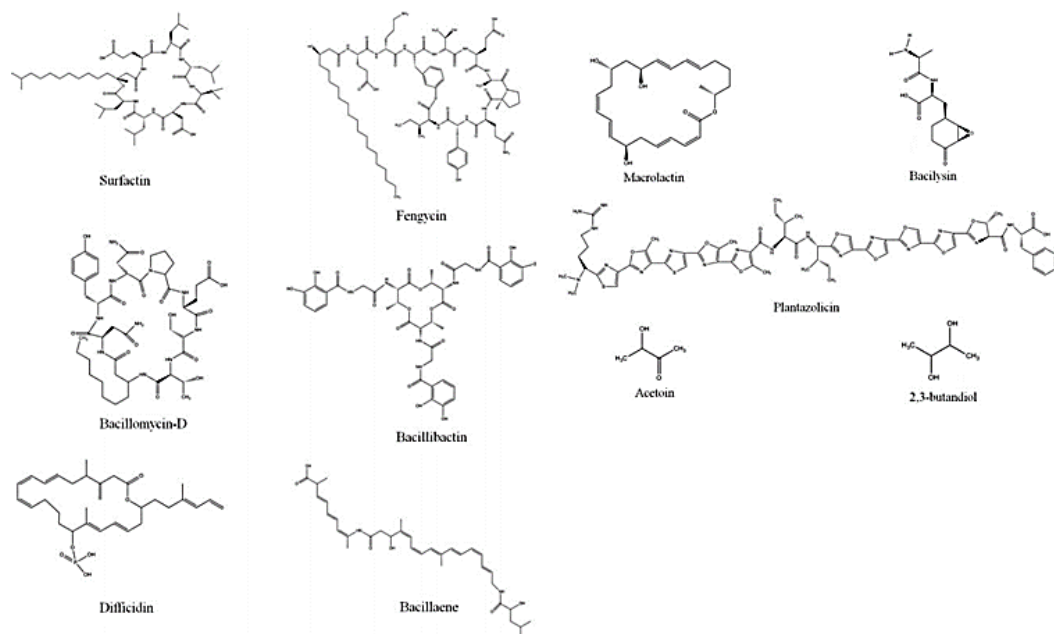


Figure 2: Structure moléculaire des composés ribosomaux et non ribosomaux synthétisés par *B.velezensis*

II.3.3.1. Molécules antibactériennes :

B.velezensis exerce une activité de biocontrôle en synthétisant la difficidine, la bacilysine, pour lutter contre *Xanthomonas oryzae pv. Oryzae*, *X. oryzae pv. Oryzicola* et *Erwinia amylovora* : agents causaux de la brûlure bactérienne, des stries bactériennes du riz et de la maladie du feu bactérien, respectivement. La bacilysine pourrait agir comme anticyanobactérien, contre une algue toxique et létale, *Microcystis aeruginosa* (Rabbee et al., 2019).

II.3.3.2. Molécules antifongiques :

Des études suggèrent que la présence des lipopeptides cycliques (surfactine, bacillomycine-D et fengycine) pourrait réduire la sévérité de la maladie de la pourriture de la rhizosphère de la laitue (Chowdhury et al., 2015; Rabbee et al., 2019)

II.3.3.3. Molécules nématocides

Le traitement des graines des tomates par *B. amyloliquefaciens* FZB42 a réduit le nombre d'œufs des nématodes, au niveau des racines de la tomate, des vers juvéniles, dans le sol et a supprimé les galles de la tomate. Cette activité nématocide, exercée par *B. amyloliquefaciens*, a été attribuée au plantazolicine, codé par le gène *pzn* (Burkett-Cadena et al., 2008; Liu et al., 2013; Rabbee et al., 2019).

II.3.3.4. Sidérophores :

Le fer, un oligo-élément indispensable à la croissance de tous les organismes vivants, utilisé généralement, comme cofacteur, dans différentes réactions biochimiques. Chez *B. amyloliquefaciens* FZB42, l'acquisition des ions ferriques, à partir des composés minéraux et organiques de la rhizosphère, est réalisée par les sidérophores bacillibactins. Ces peptides, ayant une grande affinité pour le Fe^{3+} , sont formés par les nonribosomal peptide synthetases. Ils agissent en privant les bactéries phytopathogènes, et des champignons des ions du fer, inhibant ainsi leur croissance (Chen et al., 2007; Fukushima et al., 2013; Rabbee et al., 2019).

II.3.3.5. Composés organiques volatiles

Les COVs synthétisés par *B. amyloliquefaciens* FZB42 possèdent une activité antimicrobienne et favorisent la croissance des plantes ainsi que la résistance systémique, conférant, par conséquence, à *Bacillus*, un potentiel de biocontrôle vis-à-vis des phytopathologies (Compant et al., 2005; Ossowicki et al., 2017; Rabbee et al., 2019).

II.1.4. Environnements et niches de *Bacillus* spp.

Les espèces *Bacillus* sont des bactéries à Gram-positif saprophytes communes dans le sol, l'eau, les produits fermentés, les intestins, la poussière et l'air. Ces bactéries sont considérées comme allochtones et pénètrent dans l'intestin par association avec des aliments.

II.3.4.1. Rhizosphère

Décrit pour la première fois, par *Lorentz Hiltner*, en 1904, le Rhizosphère est une partie du sol (généralement 1-3 mm autour des racines), riche en nutriments. C'est un environnement

compétitif, colonisé par plusieurs communautés microbiennes, qui se battent pour survivre (Hartmann et al., 2008; Sasse et al., 2018.). Plusieurs études ont montré que *B. velezensis*/*B.methylotrophicus*/*B. amyloliquefaciens subsp. plantarum* a été isolée depuis les rhizosphères de différentes plantes (Fan et al., 2017).

II.3.4.2. Intestins

Le microbiote intestinal est composé de plusieurs espèces de micro-organismes, dont des bactéries, des levures, et des virus (Rinninella et al., 2019). Les bactéries dominantes identifiées dans les intestins (gros et grêle) sont essentiellement les espèces des : *Lactobacilli*, *Streptococci*, *Enterobacteria*, *Bifidobacteria*, *Bacterioides*, *Clostridia* et *Bacillus* (Hong et al., 2005). Une étude a révélé la présence des espèces de *Bacillus* (*B. subtilis* et *B. licheniformis*) dans la matière fécale humaine (entre 5×10^3 et 5×10^6 UFC par g de fèces) (Hong et al., 2005; Macfarlane et al., 1986). *B. cereus* (probablement *B. thuringiensis*) a été isolée à partir des déchets fécaux chez des ouvriers de serres exposés aux biopesticides (Hong et al., 2005; Jensen et al., 2002).

II.2. Rhizobactéries favorisant la croissance des plantes

Les PGPR, rhizobactéries favorisant la croissance des plantes sont des bactéries rhizosphériques/endophytiques colonisant l'intérieur et/ou l'extérieur des racines. Elles appartiennent à différents genres bactériens : *Microbacterium*, *Pantoea*, *Achromobacter*, *Rhizobium*, *Pseudomonas*, *Bacillus*, *PaeniBacillus*, *Enterobacter*, *Burkholderia*, *Methylobacterium*, *Azospirillum* et *Variovorax*, etc. Ces bactéries assurent à leur hôte une tolérance vis-à-vis des stress abiotiques (Abbas et al., 2019). *B. velezensis* est connue en tant que rhizobactérie favorisant la croissance des plantes tout en supprimant les microorganismes pathogènes, à savoir : les bactéries, les champignons et les nématodes (Rabbee et al., 2019).

Les PGPR sont impliquées dans : (1) la production des métabolites secondaires antimicrobiens (antagonisme), (2) la compétition pour les niches et les nutriments (colonisation), et (3) la stimulation de la résistance systémique induite (RSI) (Ongena & Jacques, 2008). La stimulation de la résistance systémique induite (RSI) dépend de la reconnaissance des éliciteurs sécrétés par les PGPRs, tels que : les lipopolysaccharides, les peptidoglycane, la flagelline, les molécules du quorum-sensing, les lipopeptides cycliques et les sidérophores chélateurs du fer (Rabbee et al., 2019). La RSI est stimulée, soit par la voie de signalisation de l'acide jasmonique /éthylène, soit par celle de l'activation de l'acide salicylique, ou par l'activation des 2 voies, induisant par

conséquent, l'expression du *NPR1*, un gène responsable d'une protéine régulatoire de défense (Ongena & Jacques, 2008).

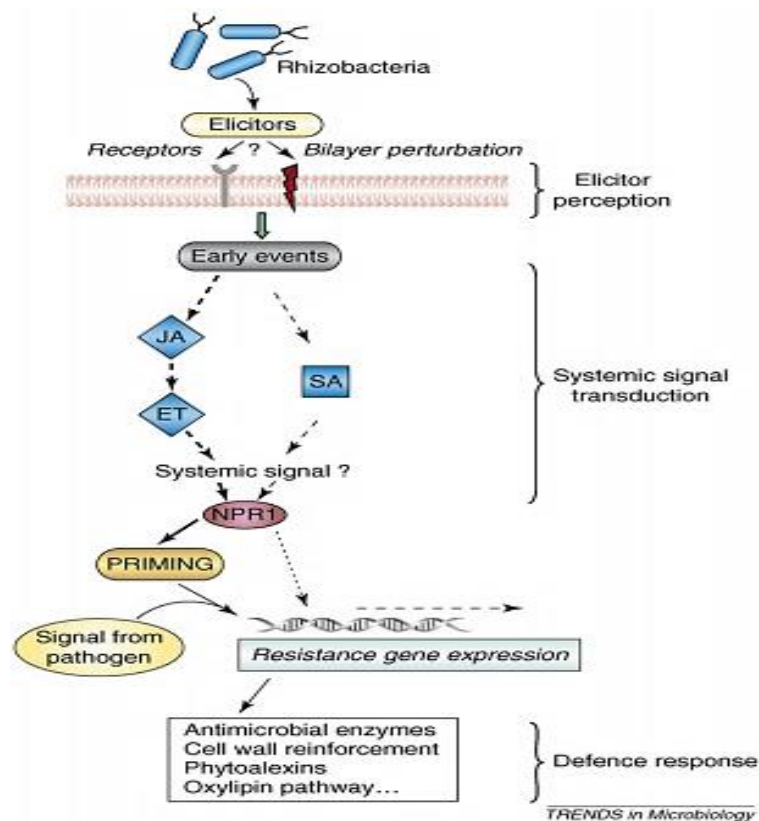


Figure 3: Schéma général illustrant la résistance systémique induite par les PGPR et ses voies de signalisation

(Ongena & Jacques, 2008)

II.2.1. Commercialisation des PGPRs

En tant que PGPR, capable de former des endospores et s'adapter à différents stress abiotiques (dessiccation, chaleur, ...), *Bacillus spp.* est largement utilisée dans le domaine de l'agriculture. Des produits, agissant comme : biofertilisant, biofongicide, biopesticide, à base de *Bacillus* sont maintenant mis sur le marché, notamment *RhizoVital*® (*Bacillus amyloliquefaciens* FZB42 ; ABiTEP, GmbH, Berlin, Allemagne), *Amylo-X*® WG (*B. amyloliquefaciens* subsp. *plantarum* D747 ; Certis Europe BV, Pays-Bas), *RhizoPlus*® (*B. subtilis* FZB24 ; ABiTEP), *Sonata*® (*B. pumilus* QST2808 ; AgraQuest, Inc., Davis, Californie, États-Unis), *Taegro*® (*B. subtilis* var. *amyloliquefaciens* FZB24 ; Novozymes Biologicals, Inc., Salem, Virginie, États-Unis (Pérez-García et al., 2011; Rabbee et al., 2019). Les spores vivantes de *B. amyloliquefaciens* FZB42, récemment classées comme souche de *B. velezensis*, ont été commercialisées sous forme de bio-inoculant, *RhizoVital*®, contrôlant une variété de phytopathologies transmises par le sol, stimulant

ainsi la croissance des plantes. Au contact des racines, les spores de *Bacillus FZB42* se multiplient et produisent des molécules bénéfiques à la plante : des enzymes, des phytases et des métabolites secondaires, actifs, biologiques, agissant par suppression de la microflore pathogène des plantes (Rabbee et al., 2019). Dans le cadre de la lutte contre *Botrytis cinerea*, l'agent étiologique de la pourriture grise qui infecte plus de 200 espèces de plantes, dans le monde entier ; *Botrybel* (Agricaldes, Spain), un fongicide, à base de *B. velezensis* a été mis sur le marché (Bui et al., 2019; Rabbee et al., 2019).

II.3. Salinité : une menace de l'agriculture et de la santé publique

II.3.1. Salinité : une problématique de l'agriculture

La salinité est l'une des principales menaces de l'agriculture. Provoquant la diminution de la production végétale et altérant diverses fonctions des plantes : physiologiques, biochimiques et moléculaires ; ce phénomène entrave la germination, la croissance, la photosynthèse, la transpiration et la conductance stomatique. La salinité génère un stress osmotique en diminuant le potentiel hydrique et la pression de turgescence des feuilles. Elle engendre une toxicité ionique qui cause l'augmentation de la teneur en espèces réactives de l'oxygène (ROS) dans la cellule végétale et perturbe l'homéostasie ionique. Ainsi, la salinité déséquilibre l'absorption des nutriments, désagrège la membrane et les différentes structures cellulaires végétales. Par conséquent, la salinité entraîne un stress osmotique et ionique chez les plantes (Arif et al., 2020; Isayenkov & Maathuis, 2019; Mahdi et al., 2020).

Le quinoa utilise différentes stratégies afin de tolérer la salinité : le contrôle efficace de la séquestration du Na^+ dans les vacuoles foliaires, la charge du Na^+ dans le xylème, la tolérance élevée aux ROS, la rétention du K^+ , le maintien des faibles niveaux de Na^+ cytosolique, la réduction de l'activité du canal tonoplaste et le pompage de H^+ dans la cellule mésophyle (Filho et al., 2017). De nouvelles approches basées sur l'utilisation des PGPR halotolérantes ont été étudiées afin d'améliorer la réponse physiologique du quinoa vis-à-vis le stress salin. En effet, grâce à leur capacité de produire les sidérophores, les phytohormones, fixer le nitrogène et solubiliser le phosphate minéral, les PGPR diminuent les dégâts causés par la salinité (Hinojosa et al., 2018).

L'utilisation de plantes et de microorganismes tolérants au sel est une stratégie prometteuse pour atténuer les effets induits par le sel sur les cultures.

II.3.2. Salinité : une problématique de santé publique

Depuis des millénaires, le sel, un minéral essentiel à la vie humaine, compte parmi les condiments alimentaires les plus anciens et omniprésents, utilisé dans les pratiques de conservation des aliments, telles que le salage et les saumures ; cependant, des études ont conclu que la salinité fécale est un facteur impliqué dans la modification du microbiote intestinal et déterminant de l'état de santé. En effet, la consommation élevée de sel a été associée à plusieurs maladies, notamment l'obésité, le syndrome métabolique, le cancer de l'estomac, l'hypertension et les maladies cardiovasculaires, entraînant une augmentation de la mortalité à l'échelle mondiale (He & MacGregor, 2009; Mm et al., 2017; Y et al., 2015). Des études expérimentales chez l'animal (Tobian & Hanlon, 1990) et des études épidémiologiques chez l'homme (Nagata et al., 2004; Perry & Beevers, 1992; Xie et al., 1992) ont montré qu'un régime riche en sel peut avoir un effet direct sur les accidents vasculaires cérébraux (AVC). Une corrélation positive, significative entre l'excrétion urinaire du sodium sur 24 heures et la mortalité des individus par AVC (He & MacGregor, 2009; Perry & Beevers, 1992). En effet, la salinité provoque la protéinurie et cause les maladies rénales, car, la consommation accrue du sel accroît l'excrétion urinaire de protéines et augmente de façon marquée la vitesse de détérioration de la fonction rénale (He & MacGregor, 2009).

Il a été démontré qu'une réduction de l'apport en sel diminue l'hypertrophie ventriculaire gauche chez les patients souffrant d'hypertension artérielle (Ferrara et al., 1984; He & MacGregor, 2009). D'autres études ont montré que l'infection par la bactérie *Helicobacter pylori*, à l'origine des ulcères duodénaux et gastriques et du cancer de l'estomac, est étroitement associée à la consommation excessive de sel dans différents pays, tant chez les femmes que chez les hommes (Beevers et al., 2004; Tsuji et al., 2006). Les aliments qui contiennent de fortes concentrations de sel sont irritants pour la paroi de l'estomac. Il est possible que cela aggrave l'infection par *H.pylori* et conduise ensuite au cancer de l'estomac (He & MacGregor, 2009).

II.3.3. Bactéries et résistance à la salinité

L'osmoadaptation décrit les manifestations physiologiques et génétiques de l'adaptation à des environnements selon les niveaux d'eau (Sleator & Hill, 2002). Afin de survivre et maintenir leur équilibre osmotique, les microorganismes adoptent l'une des deux stratégies suivantes :

- Le « salt in cytoplasm » en augmentant la concentration du sel (KCl) dans leur cytoplasme. Les ions K^+ neutralisent la charge négative des enzymes cytoplasmiques réduisant ainsi les

forces répulsives et maintenant par conséquent la structure native des enzymes (Mirete et al., 2015; Sleator & Hill, 2002).

- L'« osmoprotection » en utilisant des solutés dits 'compatibles' (glycine, bétaine et glycérol). Ces molécules hautement solubles n'interagissent pas avec les protéines. Elles agissent comme osmoprotecteurs, induisant la restauration du volume cellulaire et de la pression de turgescence perdue lors du stress osmotique et stabilisant les fonctions des enzymes cellulaires (Mirete et al., 2015 ; Sleator & Hill, 2002).

II.3.3.1. Pyrophosphatase membranaire

Les pyrophosphatases (*PPases*) membranaires sont des protéines de transport homodimériques qui utilisent l'énergie pyrophosphate (*PPi*) pour maintenir des gradients de cations monovalents chez les procaryotes, les plantes et les protistes. Toutes les *PPases* membranaires ont une structure unique avec un site d'hydrolyse de *PPi* et un canal de conductance ionique à proximité. Le processus de transport est déclenché par un proton généré par l'eau nucléophile pendant l'hydrolyse du *PPi* et reflète le mouvement physique d'un cation hydraté entre les groupes acides situés le long du canal (Baykov et al., 2013). En se basant sur la théorie fonctionnelle de la densité, Ling yang et al ont étudié le mécanisme de la *PPase* inorganique d'*E.coli*, appartenant à la famille des enzymes de transfert du phosphorus. Elle est divalente, tétranucléaire et métalodépendante, catalysant la réaction réversible de l'interconversion du pyrophosphate et de l'orthophosphate et nécessitant quatre ions Mg^{2+} comme cofacteurs. Cette enzyme permet de contrôler les niveaux du *PPi* intracellulaire, au cours du métabolisme et de synthétiser par conséquent, les biopolymères (ADN/ ARN) (L. Yang et al., 2009). Des études ont montré que la *PPase* de *Rhodospirillum rubrum* fonctionne comme une pompe de protons. Elle appartient à la famille des H^+ -*PPases* indépendantes de K, comme la plupart des *PPases* des autres procaryotes (Moyle et al., 1972). D'autres études ont démontré l'existence de *PPases* membranaires, Na^+ *PPases*, chez *Methanosarcina mazei*, *Moorella thermoacetica* et *Thermotoga maritima*, catalysant le transport de Na^+ plutôt que de H^+ (Belogurov et al., 2005; Malinen et al., 2007). Cette pyrophosphatase génère un potentiel membranaire tout en transportant le Na^+ . C'est une pompe de sodium électrogène (Baykov et al., 2013). Une troisième famille de pyrophosphatase a été découverte chez *Bacteroides vulgatus*, transportant à la fois les protons et le sodium, Na^+ , H^+ *PPase*. (Luoto et al., 2013a). Les gènes codant cette enzyme sont présents essentiellement chez des bactéries du tractus gastrointestinal humain. Les Na^+ , H^+ *PPases* ont besoin de Na^+ pour leurs activités d'hydrolyse et de transport et sont ensuite activées par K^+ (Luoto et al., 2013a; Mirete et al., 2015).

MATERIELS
&
METHODES

III. MATERIELS & METHODES

III.1. Souches bactériennes et niches écologiques

Les bactéries étudiées ont été isolées à partir de différentes niches écologiques : *QA1* et *QA2* provenant de la rhizosphère du Quinoa. Les souches *Z16*, *DN59* et *DN74* provenant, respectivement, du produit laitier de brebis (AZARIS), du lait de la jument, et du lait de l'ânesse.

Le tableau suivant décrit l'ensemble des souches bactériennes utilisées dans ce projet (**Tableau 1**).

Tableau 1: Description des souches bactériennes utilisées dans notre étude

| Souche | Caractéristiques, niches écologiques | Référence |
|-----------------------------------|--|------------------------|
| <i>E.coli DH5α</i> | (F ⁻) supE44 ΔlacU169 (φ80lacZΔM15) ΔargF hsdR17 recA1 endA1 gyrA96 thi-1 relA1 | (Demarre et al., 2005) |
| <i>E.coli DH5α λpir</i> | (F ⁻) supE44 ΔlacU169 (φ80lacZΔM15) ΔargF hsdR17 recA1 endA1 gyrA96 thi-1 relA1 λpir lysogen | (Demarre et al., 2005) |
| <i>E.coli sm10 λpir</i> | (F ⁻) RP4-2-Tc::Mu recA λpir lysogen [KmR] | (Demarre et al., 2005) |
| <i>Bacillus licheniformis QA1</i> | PGPR, Rhizosphère du Quinoa | Mahdi et al, 2020. |
| <i>Bacillus velezensis QA2</i> | PGPR, Rhizosphère du Quinoa | Collection Labo CIPEM |
| <i>Bacillus velezensis Z16</i> | PGPR, Probiotique, produit laitier de la brebis ; azariz | CL CIPEM |
| <i>Bacillus velezensis DN59</i> | PGPR, Probiotique, lait de la jument | CL CIPEM |
| <i>Bacillus velezensis DN74</i> | PGPR, Probiotique, lait de l'ânesse | CL CIPEM |

III.2. Milieux et conditions de culture

Les bactéries ont été mises en culture dans les milieux : gélosé (TSA) et liquide (TSB).

III.2.1. Préparation du TSB medium

Le bouillon TSB de culture est préparé en ajoutant 9 mg de TSB poudre à 300 ml d'eau ultrapure stérile (MilliQ). Et les bactéries sont mises en culture dans ce milieu sont incubées à 37°C, overnight (12-18 heures), dans un incubateur à sec (innova 43, New Brunswick) (**Figure 4**).



Figure 4:Incubateur à sec innova 43, incubator shaker series, New Brunswick, employé dans l'incubation bactérienne

III.2.2. Préparation du TSA medium

Le milieu TSA : Trypto-caséine soja agar est conçu en ajoutant 9 mg du TSB et 4,5 mg agar bactériologique de type E (Egondola, s. d.) dans 300 ml d'eau ultrapure stérile.

Les bactéries cultivées dans ce milieu sont incubées dans une étuve (VWR, INCU-Line, E-INC56-002) (**Figure 5**), à 37°C, overnight (12-18 heures).



Figure 5: Etuve VWR, INCU-Line, E-INC56-002, employée dans l'incubation bactérienne

III.3. Cryoconservation des souches :

Afin de garantir une bonne conservation des bactéries, à long terme, chaque souche (*E.coli DH5 α* , *E.coli DH5 α ::pUC19*, *E.coli DH5 α ::pGEX4T2*, *QA1*, *QA2*, *Z16*, *DN59*, *DN74*) a été cryoconservée, selon le protocole suivant : Dans un cryotube (**Figure 6**), ont été ajoutés 900 μ l de la culture bactérienne de nuit (TSB) et 100 μ l du Diméthylsulfoxyde, DMSO (cryoprotecteur). Les cryotubes sont ensuite conservés à -80°C.



Figure 6: Cryotubes étiquetés

III.4. Criblage des souches résistantes à la salinité

Afin de tester l'aptitude des 4 souches *BV* (*QA2*, *ZI6*, *DN59*, *DN74*) à tolérer différentes concentrations de NaCl, le test de salinité a été réalisé en milieu solide et liquide, en utilisant *E.coli DH5α* comme contrôle négatif et *Bacillus liqueniformis QA1*, comme contrôle positif.

III.4.1. Milieu solide

Sur milieu gélosé, le test de salinité a été réalisé en ensemençant les milieux de culture TSA, préparés à différentes concentrations de NaCl (0,3,5,8,12, 15) % (VII.3, **Tableau 7**), par les souches bactériennes à étudier, puis en les incubant, dans l'étuve, à 37°C, pendant 12 à 18 h.

III.4.2. Milieu liquide

Après une culture de nuit sur milieu TSB, pour chacune des 6 souches (*E.coli DH5α*, *QA1*, *QA2*, *ZI6*, *DN59*, *DN74*), la densité optique a été mesurée par spectrophotomètre (UV-6300PC- Double beam spectrophotometer) (**Figure 7**) et les milieux de culture avec différentes concentrations de NaCl ont été préparés (VII.3, **Tableau 7**). Une fois, les volumes de dilution (de la culture bactérienne et des milieux) déterminés, les puits de la microplaque (96 puits) ont été remplis à 200 µl / puit, en triplicata.



Figure 7: Spectrophotomètre UV-6300PC- Double beam spectrophotometer, utilisé dans la mesure de la DO

La microplaque est ensuite incubée à 37°C, sous agitation, pendant 24 h, dans le lecteur de la densité optique, de microplaques multimode, *victor nivo*, *E-VICTOR-001* (Figure 8).



Figure 8: Lecteur des microplaques multimode, victor nivo, E-VICTOR-001, utilisé dans la mesure de la DO, pour le test de salinité sur milieu liquide

III.5. Extraction du génome bactérien :

III.5.1. Protocole de l'extraction

L'extraction du génome des bactéries (*QA1*, *QA2*, *Z16*, *DN59*, *DN74*) a été effectuée, selon Invitrogen, *PureLink™ Genomic DNA mini kit*. (VII.5).

III.5.2. Contrôle qualité de l'extraction génomique par électrophorèse :

Le gel d'agarose 0,7% a été conçu en ajoutant 0,35 g d'agarose et 50 ml du TAE dans un erlenmeyer. Ce mélange est chauffé, pendant 1 minute au micro-ondes. Après refroidissement, 5µl du BET ont été ajoutés. Le contenu de l'erlenmeyer a été ensuite versé dans la colonne d'électrophorèse (4 pièces). Un volume de 5 µl du marqueur de taille et 3µl de l'ADN extrait ont été mélangés avec une gouttelette du tampon de charge puis déposés dans les puits. Dans une cuve (Figure 9), la migration sur gel d'électrophorèse a été effectuée, dans les conditions suivantes : 100 Volts, 30 min. Le gel a été ensuite visualisé sous UV par VWR, Transilluminator E-GELDOC-001, smart 3 (Figure 10).



Figure 9: Cuve d'électrophorèse



Figure 10: Transilluminator VWR, E-GELDOC-001, smart 3, servant à la visualisation du gel d'électrophorèse sous UV

III.6. Amplification par PCR (Polymerase Chain Reaction)

La PCR permet d'amplifier spécifiquement un fragment d'ADN situé entre deux oligonucléotides, composés d'une vingtaine de paires de bases. Afin d'optimiser la réaction de PCR, les amorces doivent être spécifiques de la région à amplifier, avec des paramètres (% GC et Tm) optimum. De plus, elles ne doivent ni s'hybrider entre elles, ni former des structures secondaires. Pour cibler le gène *ppaX* et garantir le bon déroulement de la PCR, une partie du travail a été réalisée *in silico*, afin de concevoir minutieusement des amorces nucléotidiques efficaces et contrôler leur qualité : en cherchant le génome de *B. velezensis* sur la base de données « ncbi, genome », puis en identifiant le gène *ppaX* par « ncbi, gene » (Figure 11).

Bacillus velezensis strain CBMB205 chromosome, complete genome

NCBI Reference Sequence: NZ_CP011937.1

[GenBank](#) [Graphics](#)

>NZ_CP011937.1:586901-587551 Bacillus velezensis strain CBMB205 chromosome, complete

genome

```
ATGACTGATAAAGCGTAAACCGCCATTTTATTTGATCTCGACGGCAGCTGATTGACACGAATGAAGTGA
TTATCGCTTCTTACCTTCATACGCTTGATCATTATTGCCCGGGCAGTTCAAAGGGGAAGATGTGCTTCC
GTTTATCGGCCCGCCTCTGTATGAAACGTTTGACGGCATTAAATGCTGAAAAGTGCGATGAGATGATCAGC
ATGTACAGAGCATTCAACCATGAAAAGCAGCATGAGCTCGTCACGGAGTACGAAACGGTTTATGAAACGC
TTGATGAATTGAAAAAGCGGGGTATCAGCTGGGTATTGTCAACCACGAAGCTGAGGGATACAGTCAATAT
GGGATTGAAGCTGACAGGCATCGGGCGTTTTTCGATACTGTCGTACGCTTGATGATGTCAAGCATCCG
AAGCCTGACCCCGAGCCTGTGCGGCTTGCCTCGGCCGGCTTGGGTGCGATCCGTGGAAGCCATAATGG
TCGGTGACAATTATCAGATGTGATGGCGGGCAAAAACGCCGGCACGAAAACAGCCGGCGTCCGCTGGAC
GATTAAGGGCGCACAGACGCTTCCGCCATGAACCCGATTATATGCTCGAGAAAATGAGTGATTTATTG
CACATCACCGGAGTGAAGTAA
```

Change region shown

Whole sequence

Selected region

from: to:

Figure 11: Visualisation de la séquence nucléotidique du gène *ppaX* de *Bacillus velezensis* CBMB205, NCBI, GenBank

Grâce au logiciel SnapGene, version 5.2.4 (*SnapGene / Software for Everyday Molecular Biology*, s. d.) et aux plateformes : Primer-Blast de NCBI (*Datasets*, s. d.) et sequence manipulation suite-PCR Primer Stats (*PCR Primer Stats*, s. d.), le design et le contrôle qualité des oligonucléotides ont été effectués. Le tableau suivant englobe tous les oligonucléotides conçus ([Tableau 2](#)).

Tableau 2: Liste des oligonucléotides utilisés spécifiquement dans notre étude

| Oligonucléotide | 5'>>> séquence>>> 3' | Site de Restriction |
|---------------------------|--|---------------------|
| Forward <i>ppax F</i> | GT aagctt AGACGCATGAAGGGGTATGCCGA | HindIII |
| Reverse <i>ppax RWT</i> | CG g gatcc CGTCTGATAAACATGCCACAAT | BamHI |
| Forward <i>ppax PS 1</i> | GC gaattc GACGGCACGCTGATTGACACGAAT | EcoRI |
| Reverse <i>ppax PS 2</i> | CG g gatcc ATGGTTGAATGCTCTGTACATG | BamHI |
| Forward <i>ppax GST F</i> | CG g gatcc ACTGATAAACGTGTAACCGCCA | BamHI |
| Reverse <i>ppax GST R</i> | CG gaattc CCGTCTGATAAACATGCCACAA | EcoRI |
| Forward <i>ppax F</i> | GT aagctt AGACGCATGAAGGGGTATGCCGA | HindIII |
| Reverse <i>ppax His R</i> | CG g gatcc CTAgtgatggtgatggtgatgCTTCACTCCGGTGATGTGC | BamHI |

Le motif gtgatggtgatggtgatg code pour 6 histdines.

La PCR a été effectuée *In Silico* par le logiciel SnapGene, et *in vitro*. Dès leur réception sous format lyophilisé (+4°C), les amorces ont été solubilisées dans l'eau ultrapure stérile, selon les recommandations du fournisseur, ensuite diluées 10 fois et conservées à -80°C. Les amplifications sont réalisées à l'aide d'un thermocycleur (VWR, E-THERMC-001, Doppio, [Figure 12](#)) et d'un master mix (vanzym), selon les instructions du fournisseur, mentionnées dans le [Tableau 3](#) ci-dessous.

Tableau 3:Récapitulatif du protocole pour la réalisation de la PCR

| Tubes | MIX | ADN | FOR | REV | Tm (°C) | H ₂ O | Vtt |
|------------------|---------|--|-------------------|-------------------|-----------|------------------|-----|
| | | | <i>ppaxF</i> | <i>ppax RWT</i> | 58 | | |
| A (C-) | 12.5 µl | ----- | 1 µl | 1 µl | | 10.5 µl | |
| 1, 5, 9, 13, 17 | 12.5 µl | 1 µl <i>QA1, QA2, ZI6, DN59, DN74</i> | 1 µl | 1 µl | | 9.5 µl | |
| | | | <i>ppax FI</i> | <i>ppaxRI</i> | 48 | | |
| B (C-) | 12.5 µl | ----- | 1 µl | 1 µl | | 10.5 µl | |
| 2, 6, 10, 14, 18 | 12.5 µl | 1 µl <i>QA1, QA2, ZI6, DN59, DN74</i> | 1 µl | 1 µl | | 9.5 µl | |
| | | | <i>ppax GST F</i> | <i>ppax GST R</i> | 58 | | |
| C (C-) | 12.5 µl | ----- | 1 µl | 1 µl | | 10.5 µl | |
| 3, 7, 11, 15, 19 | 12.5 µl | 1 µl <i>QA1, QA2, ZI6, DN59, DN74</i> | 1 µl | 1 µl | | 9.5 µl | |
| | | | <i>ppaxF</i> | <i>ppaxHIST R</i> | 58 | | |
| D (C-) | 12.5 µl | ----- | 1 µl | 1 µl | | 10.5 µl | |
| 4, 8, 12, 16, 20 | 12.5 µl | 1 µl <i>QA1, QA2, ZI6, DN59, DN74</i> | 1 µl | 1 µl | | 9.5 µl | |

25 µl



Figure 12: Thermocycleur VWR, E-THERMC-001, Doppio, utilisée pour la PCR

III.6.1. Programmes des PCRs

Les réactions de PCRs réalisées par les amorces *ppaxF*, *ppaxRWT*, *ppaxGSTF*, *ppaxGSTR* et *ppaxHISTR* se sont déroulées selon le programme '**ppax IHSANE HM 58'** (Figure 13). Cependant, celles effectuées par les oligonucléotides *ppaxFI* et *ppaxRI* sont déroulées selon les étapes signalées dans la Figure 14.

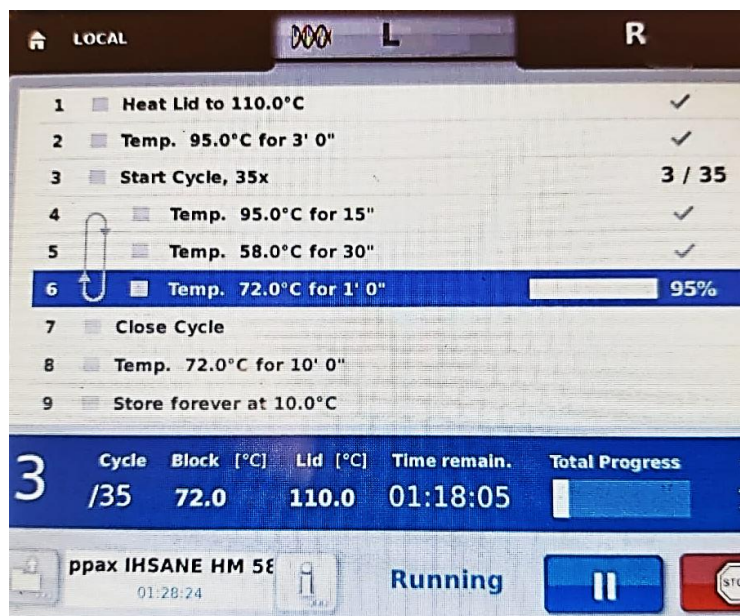


Figure 13: Programme de la PCR '**ppax IHSANE HM 58'**

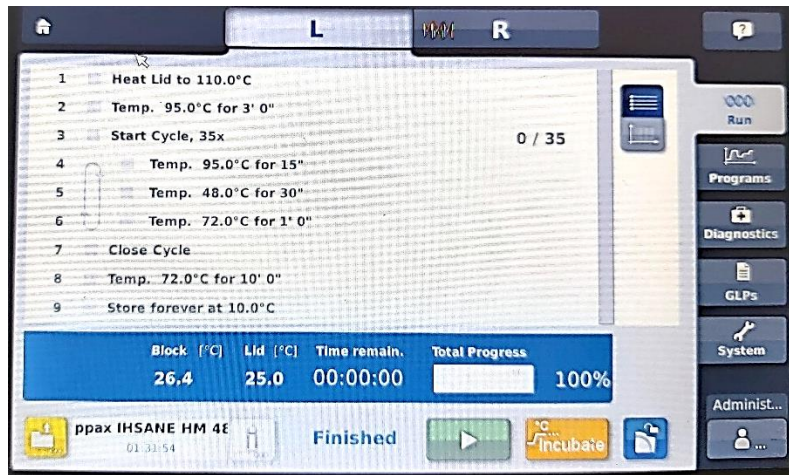


Figure 14: Programme de PCR 'ppax IHSANE HM 48'

Le contrôle qualité des PCR a été réalisé par électrophorèse sur gel d'agarose 0,7%.

III.7. Séquençage sanger

Les produits PCR du gène 'ppaX' complet, amplifiés par les amorces *ppaxF* et *ppaxRWT*, des 5 souches bactériennes (tubes N° : 1, 5, 9, 13, 17) ont été séquencés par sanger sequencing, selon le protocole suivant : Les produits PCR sont dosés par le Nanodrope (VWR, mySPEC, E-MYSPEC-001)

(**Figure 15**), en rinçant le puit , en calibrant l'appareil (blanking) par 2 µl d'eau ultrapure stérile puis, en déposant 1 µl du produit PCR.

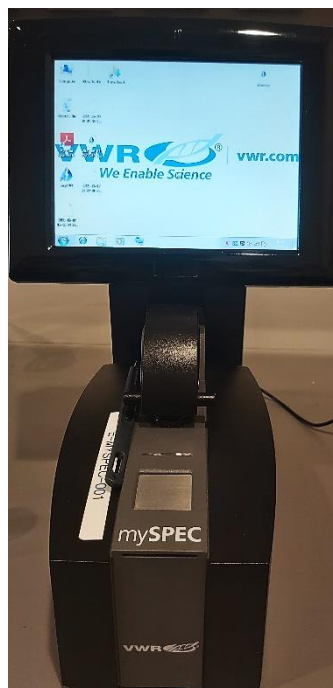


Figure 15: Nanodrope VWR, mySPEC, E-MYSPEC-001, utilisé pour le dosage des AN

La purification enzymatique de 7,5 µl des produits PCR a été effectuée par 3 µl du réactif de nettoyage ExoSAP-IT™ (*ExoSAP-IT™ PCR Product Cleanup Reagent*, s. d.) ; et 30 cycles de PCR ont été lancés afin de dénaturer la Taq Polymérase et hydrolyser les nucléotides en excès.

Pour 1 µl du primer (forward/ reverse), ont été ajoutés 2 µl du BigDye Terminator, 1 µl du 5x seq Buffer et 3 µl d'eau stérile (Mix forward/ Mix reverse). Dans 2 tubes différents ont été ajoutés 7 µl du mix forward/ mix reverse à 3 µl des produits de purification. Ensuite, une PCR de 25 cycles de séquençage a été lancée. Puis la précipitation a été effectuée par l'ajout de : 2,5 µl de l'EDTA 125 mM, 3µl d'éthanol 100%, par tube PCR, le tout a été agité, puis incubé (15 min, à température ambiante) et enfin, centrifugé pendant 20 min, à 4°C, à 14000 g. Le surnageant a été aspiré et un volume de 125 µl d'éthanol 70% a été ajouté par tube. Le tube Eppendorf a été ensuite centrifugé pendant 21 min, à 4°C, à 14000 g. Après aspiration du surnageant, les tubes ont été placés dans le dessiccateur alcoolique, pendant 15 min (Alcool> Anhydre). Dix µl de formamide ont été ajoutés à chaque tube ; puis les contenus des tubes ont été centrifugés et transvasés dans des tubes à PCR compatibles avec l'appareil de séquençage (seqstudio-232001730).

III.8. Contrôle qualité, Correction et Alignement des séquences nucléotidiques des produits du séquençage

Le contrôle qualité des chromatogrammes et la correction des séquences nucléotidiques des produits du séquençage sanger ont été effectués par *BioEdit*. Et l'alignement de toutes les séquences est réalisé 3 fois, par l'usage de différents programmes : *ClustalW Multiple Alignment de BioEdit* (Sanchez-Villeda et al., 2008), *Clustal Omega Multiple Alignment* (Sievers & Higgins, 2014), et *TCOFFEE Multiple Alignment* (Notredame et al., 2000).

III.9. Traduction des produits de séquençage et Alignement protéique

Après détection des ORFs (open reading frames) des produits de séquençage des souches *QA2*, *Z16* et *DN59* ; ces phases de lecture ouvertes ont été traduites en acides aminés par *ExpASy Translation Tools* (Gasteiger et al., 2003). Les séquences protéiques de la pyrophosphatase, codées par l'*ORF pSR8* (Mirete et al., 2015; *Uncultured Bacterium Clone PSR8 Putative Sodium Transporter Gene, Partial Cds*, 2015), les séquences des *PPases* de *B.subtilis* (pyrophosphatase [*Bacillus subtilis*] - Protein - NCBI, s. d.) et de *B.velezensis* (pyrophosphatase [*Bacillus*

velezensis] - Protein - NCBI, s. d.) , ainsi que les séquences PPases de QA2, Z16 et DN59 ont été alignées, à l'aide de trois programmes : Clustal Omega (Sievers & Higgins, 2014), BioEdit (Sanchez-Villeda et al., 2008) et Toffee Expresso (Armougom et al., 2006).

III.10. Extraction plasmidique

Les plasmides employés sont regroupés dans le **Tableau 4**.

Tableau 4: Description des plasmides utilisés dans les constructions de clonage

| plasmide | Caractéristiques | Référence |
|------------------------------|---|------------------------|
| <i>pUC19</i> | [ApR], LacZ, | |
| <i>pUC19 ::ppaxTC</i> | <i>pUC19 ::ppaxTC</i> ; | Notre étude |
| <i>pUC19 ::ppaxWT</i> | <i>pUC19 ::ppaxWT</i> ; | Notre étude |
| <i>pUC19 ::ppax polyHist</i> | <i>pUC19 ::ppax polyHist</i> ; | Notre étude |
| <i>pSW23T</i> | [CmR]; oriVR6K γ ; oriTRP4 | (Demarre et al., 2005) |
| <i>pSW23T ::ppax interne</i> | <i>pSW23T ::ppax interne</i> ; [CmR]; oriVR6K γ ; oriTRP4 | Notre étude |
| <i>pGEX4T2</i> | [ApR] | |
| <i>pGEX4T2 ::ppax</i> | <i>pGEX4T2 ::ppax</i> ; | Notre étude |

Les cartes de restriction des plasmides utilisés sont présentées dans les figures (**Figure 16**, **Figure 17**, **Figure 18**) suivantes :

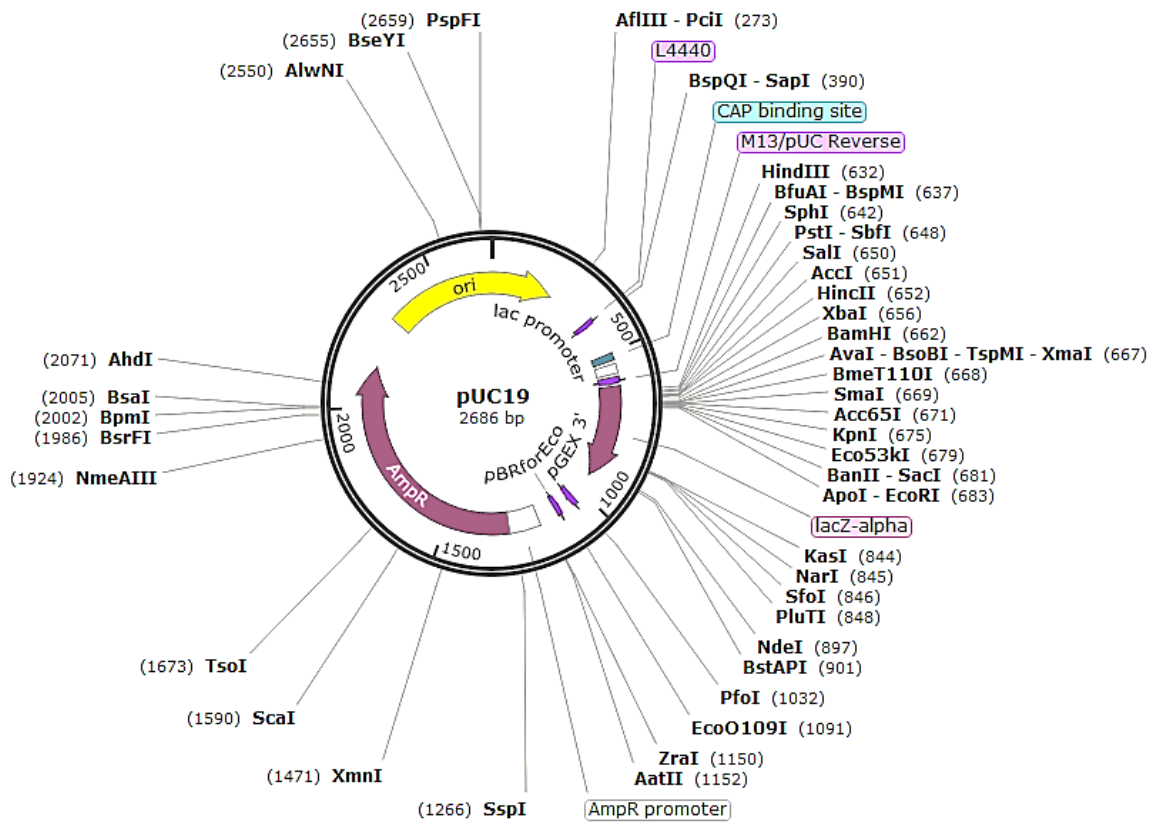


Figure 16: Carte de restriction du plasmide *pUC19*

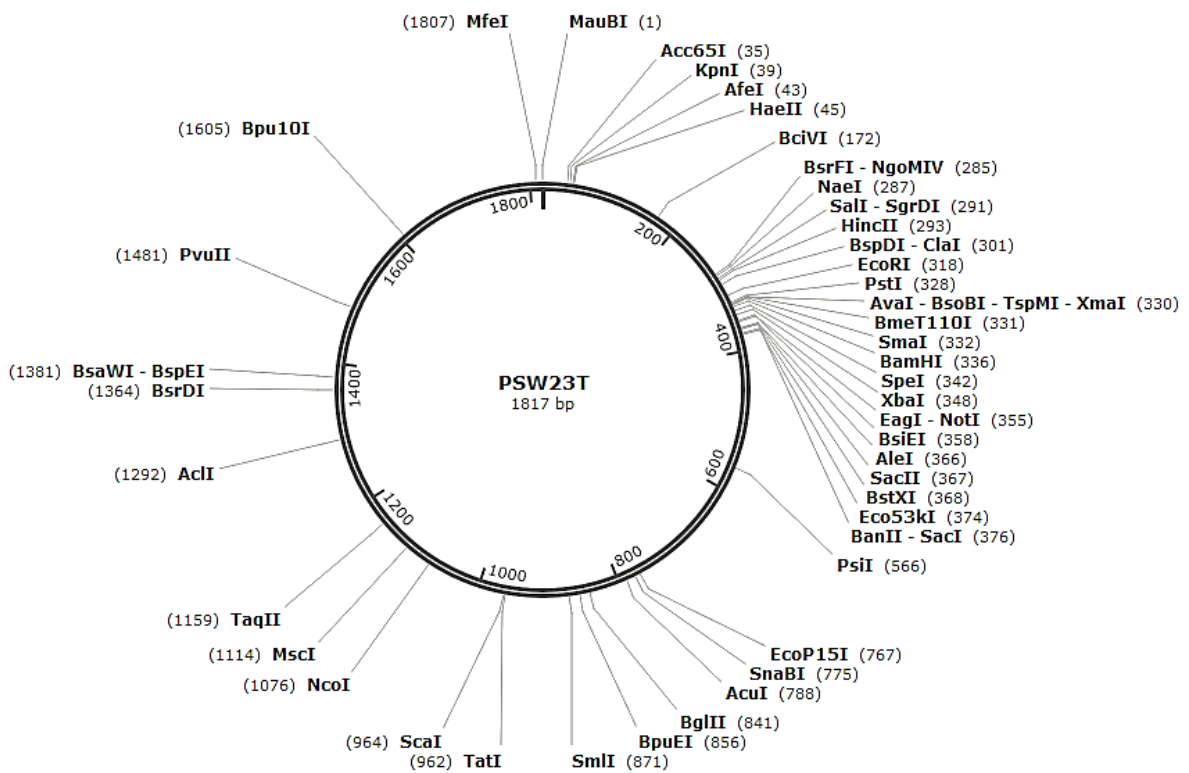


Figure 17: Carte de restriction du plasmide *pSW23T*

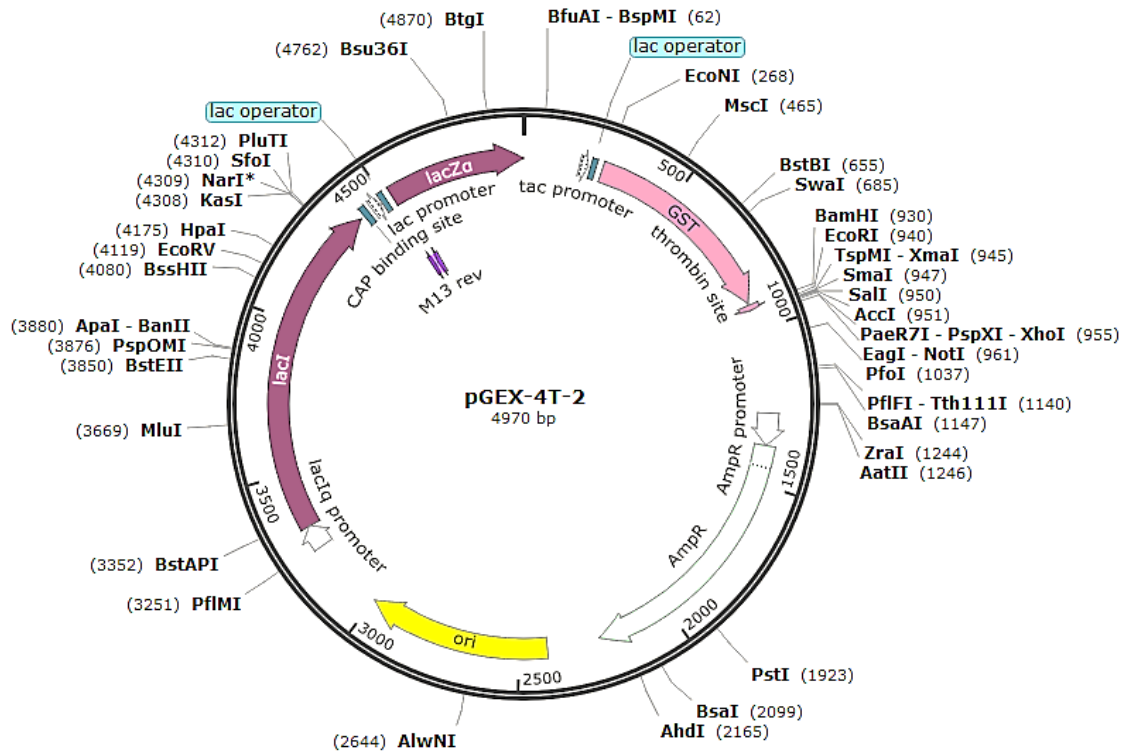


Figure 18: Carte de restriction du plasmide *pGEX-4T-2*

En suivant le protocole établi par *Monarch nucleic acid purification, Plasmid miniprep kit, BioLabs*, l'extraction plasmidique du *pUC19* et *pGEX-4T2* a été réalisée, respectivement, à partir de *E.coli DH5α :: pUC19* et *E.coli DH5α::pGEX4T2*, comme suit :

1. Centrifuger 1,5 ml de la culture bactérienne de nuit à 10 000 g, pendant 30 sec et jeter le surnageant.
2. Ajouter 200 µl du tampon B1, agiter jusqu'à homogénéisation et disparition du culot.
3. Ajouter 200 µl du Buffer B2, inverser le tube 6 fois et incubé le tube Eppendorf 1 min, à température ambiante.
4. Ajouter 400 µl du tampon de neutralisation "buffer B3", inverser le tube, jusqu'à neutralisation et incubé le tube Eppendorf à température ambiante, pendant 2 min.
5. Centrifuger le tube, pendant 5 min, à 16000 g =13000 RPM et jeter le culot.
6. Verser le surnageant dans le spin column, centrifuger pendant 1 min, jeter le surnageant.
7. Ajouter 200 µl du wash buffer1, centrifuger pendant 1 min et jeter le surnageant.
8. Ajouter 400 µl du wash buffer 2 et centrifuger pendant 1 min.
9. Placer la colonne dans un nouveau tube Eppendorf.
10. Ajouter 50 µl du DNA élution buffer et incubé les tubes Eppendorf à 50°C, pendant 1 min.
11. Centrifuger pendant 1 min, à 16 000 g et enlever la colonne interne.

12. Conserver le plasmide extrait à -20°C dans le tube Eppendorf.

Le Contrôle qualité et la vérification de l'extraction plasmidique par électrophorèse sur gel d'agarose 0,7% et la quantification a été faite à l'aide du nano-drop.

III.11. Choix des enzymes de restriction & Digestion enzymatique

Dans le but d'assurer une ligature efficace, les vecteurs (plasmides) et les inserts (produits PCR) ont été digérés par les mêmes paires d'enzymes de restriction (**Tableau 5**), afin d'avoir des bouts cohésifs et compatibles et éviter la recirculation du vecteur lors du clonage, tout en déterminant le sens de l'insertion de la séquence cible ; et ce, en commençant par l'analyse des cartes de restriction et la recherche des sites de restriction au niveau du site de polyclonage de chaque plasmide: *pUC19*, *pSW23T* et *pGEX-4T-2*. La **Figure 19** représente les enzymes choisies et leurs sites de restriction.

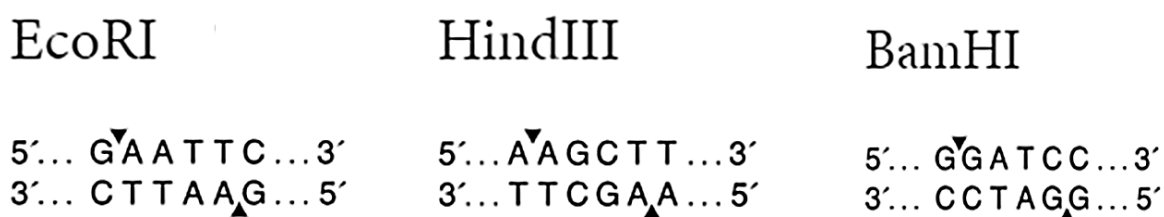


Figure 19: Enzymes employées dans la digestion enzymatique et leurs sites de restriction

Tableau 5: Récapitulatif des inserts, des amorces, des vecteurs et des enzymes de restriction employées dans cette étude

| Insert | Amorce | Vecteur | Enzyme de restriction |
|---------------------|---------------------------|------------------|-----------------------|
| <i>ppaX</i> | forward <i>ppax F</i> | <i>pUC19</i> | <i>HindIII</i> |
| | Reverse <i>ppax R WT</i> | | <i>BamHI</i> |
| <i>ppaX interne</i> | Forward <i>ppax PS 1</i> | <i>pSW23T</i> | <i>EcoRI</i> |
| | Reverse <i>ppax PS 2</i> | | <i>BamHI</i> |
| <i>ppaX</i> | Forward <i>ppax GST R</i> | <i>pGEX-4T-2</i> | <i>BamHI</i> |
| | Reverse <i>ppax GST F</i> | | <i>EcoRI</i> |
| <i>ppaX</i> | Forward <i>ppax F</i> | <i>pUC19</i> | <i>HindIII</i> |
| | reverse <i>ppax His R</i> | | <i>BamHI</i> |

Les vecteurs plasmidiques (*pUC19* et *pGEX4T2*) et les inserts (Produits PCR : *ppax RWT* et *ppax GST*) ont été digérés, en suivant le protocole résumé dans le **Tableau 6**.

Tableau 6: Récapitulatif du protocole de la double digestion enzymatique

| | <i>pUC19</i> | <i>Produit PCR ppax RWT</i> | <i>pGEX4T2</i> | <i>Produit PCR ppax GST</i> |
|--|--------------|-----------------------------|----------------|-----------------------------|
| Tampon x10 | 5 µl | 5 µl | 5 µl | 5 µl |
| ADN | 5 µl | 5 µl | 5 µl | 5 µl |
| <i>HindIII</i> | 1 µl | 1 µl | ----- | ----- |
| <i>BamHI</i> | 1 µl | 1 µl | 1 µl | 1 µl |
| EcoRI | ----- | ----- | 1 µl | 1 µl |
| H ₂ O Stérile | 38 µl | 38 µl | 38 µl | 38 µl |
| Volume total | 50 µl | 50 µl | 50 µl | 50 µl |
| Incubation 37°C, 1 nuit (12-18 h) | | | | |

III.12. Purification de l'ADN à partir du gel

Une fois la double digestion contrôlée par électrophorèse sur gel d'agarose, les volumes totaux des Produits de digestion obtenus ont été déposés sur gel d'agarose 0,7%, afin de choisir les bandes adéquates et les purifier à partir du gel, selon le protocole d'*Invitrogen (PureLink Quick Gel Extraction Kit)* :

1. Couper un morceau du gel contenant la bande concernée.
2. Peser le morceau à l'aide d'une balance sensible à 0,001 g.
3. Dans un tube Eppendorf, ajouter le buffer L3 (1,2 ml L3 pour 400 mg du gel)
4. Incuber pendant 10 min, à 50°C et inverser le tube toutes les 3 min.
5. Après dissolution totale du gel, incuber 5 min supplémentaires, à 50°C.
6. Ajouter 250 µl de l'isopropanol et mélanger.
7. Transvaser le mélange dans une colonne
8. Centrifuger pendant 1 min, à 12 000 g et enlever le surnageant.
9. Ajouter 500 µl du buffer W1 au culot.
10. Centrifuger 2 min, à une vitesse maximale
11. Placer la colonne dans un nouveau tube collecteur et ajouter 50 µl du buffer E5
12. Incuber 1 min, à température ambiante et centrifuger pendant 1 min, à vitesse maximale.

13. Conserver l'ADN purifié dans le tube Eppendorf, à -20°C.

Le port des gants et du masque protecteur contre les UV et le BET est obligatoire (Figure 20).

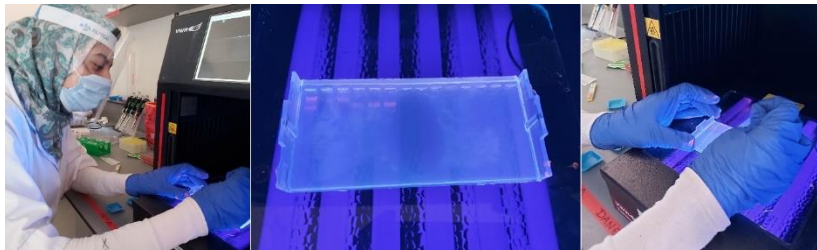


Figure 20: Matériels et précautions indispensables lors de la purification de l'ADN

III.13. Ligation des inserts avec les vecteurs digérés : expérience préliminaire de clonage

La ligation des produits purifiés a été réalisée par le *Quick-Stick-Ligase de BioLine*. Les vecteurs et les inserts ont été combinés dans un tube Eppendorf, en respectant un ratio de 108 nanogrammes ; le volume a été ajusté à 14 μ l par l'eau stérile, 1 μ l de l'enzyme QS Ligase et 5 μ l du 4x QS buffer ont été ajoutés au tube. Le tube Eppendorf homogénéisé a été incubé à température ambiante, pendant 10 min.

III.14. Transfert génétique chez *E.coli DH5 α*

III.14.1. Préparation de cellules *E.coli DH5 α* chimio-compétentes

Un volume de 5ml du LB medium a étéensemencé par une colonie de *E.coli DH5 α* et incubé à 37°C, overnight (12-18 h). Dans un erlenmeyer, contenant 15ml du milieu LB, ont été ajoutés 250 μ l de la culture de nuit et incubés à 37°C, pendant 4 heures, jusqu'à la phase exponentielle ($DO_{600nm}=0,55$). La culture bactérienne a été ensuite transvasée dans un tube Falcon stérile froid et centrifugée à une vitesse maximale, pendant 10 min, à 4°C. Les cellules ont été lavées par 15 ml de $CaCl_2$ (100 mM) et maintenues à 4°C, pendant 6 heures. Enfin, centrifugées à une vitesse maximale, pendant 10 minutes, à 4°C ; ces cellules *E.coli DH5 α* ont été lavées par 4 ml d'une solution de $CaCl_2$, 15% glycérol et stockées à -80°C, en fractions aliquotes de 500 μ l.

III.14.2. Transformation de *E.coli DH5α*

Dans un tube Eppendorf contenant 500 µl de *E.coli DH5α* chimio compétentes, 20 µl du vecteur ont été ajoutés, le tout incubés à 4°C, pendant 10 min. Les cellules ont été soumises à un choc thermique de 42°C, pendant 1 min et réincubées rapidement dans la glace, durant 3 min. Un volume de 200 µl du milieu LB, additionné de 40 µl d'ampicilline (50 mg/ml) et ensemencé par 100 µl des cellules *E.coli DH5α obtenues* a été incubé à 37°C, pendant 1 h et 30 min, sous agitation. Puis, 100 µl de cette solution cellulaire ont été étalés sur un milieu TSA enrichi d'ampicilline (50 mg/ml). Le reste a été centrifugé pendant 2 min, à vitesse maximale (13 00 RPM) ; et le culot a été étalé sur milieu (TSA + ampicilline) et incubé à 37°C, overnight.

III.15. Transformation de *Bacillus velezensis*

Afin de mettre en évidence la fonction de la *PPase* au sein de *B.velezensis*, les cellules compétentes ont été préparées et transformées par la construction plasmidique *pSW23T ::ppaXinterne* portant le gène *ppaX* tronqué, dans le but d'obtenir des *BV* mutées du gène *ppaX*.

III.15.1.Préparation des *Bacillus velezensis QA2* compétentes

Un volume de 5 ml du milieu SP, ensemencé par une colonie de *QA2*, a été incubé sous agitation, à 37°C, overnight (12- 18 h). Un erlenmeyer contenant 1 ml de la culture de nuit, dilué dans 19 ml du SP medium, a été incubé à 37°C, sous agitation, pendant 6 h, jusqu'à la phase exponentielle : $DO_{600} = 0,542$. Ensuite, 900 µl de l'erlenmeyer ont été ajoutés à 100 µl de DMSO, ainsi, les cellules ont été cryoconservées à -80°C, en fraction aliquotes.

III.15.2.Transformation des cellules compétentes de *Bacillus velezensis QA2* par le *pUC19*

Dans un tube Eppendorf, 20µl du vecteur (42,114 ng/µl) ont été ajoutés à 500 µl de *QA2* compétentes et incubés à 37°C, sous agitation, pendant 1 h et 30 min. Cent microlitres de ces cellules ont été étalées sur un milieu TSA, enrichi d'ampicilline (50 mg/ml). Le reste a été centrifugé pendant 2 min, à vitesse maximale ; et le culot a été étalé sur milieu (TSA + ampicilline), puis incubé overnight, à 37°C.

III.16. Workflow de l'étude

Les étapes de la partie expérimentale de cette étude sont résumées dans la **Figure 21**.

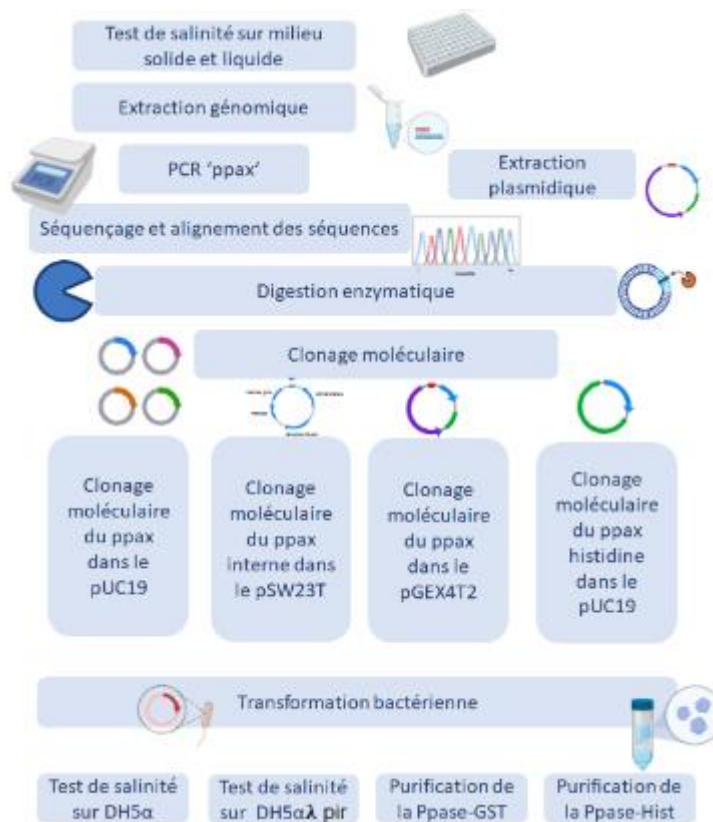


Figure 21: Plan de la partie expérimentale

Quatre constructions de clonage ont été prévues, dans le but d'obtenir :

1. Le *pUC19* recombinant, contenant le gène *ppaX* entier, utilisé dans la transformation de *E.coli DH5 α* osmosensible, afin de tester sa résistance à la salinité et déduire si ce gène *ppaX* introduit, pourrait conférer à cette bactérie la résistance à la salinité.
2. Le *pSW23T* recombinant, contenant le gène *ppaX* tronqué qui servirait à muter le gène *ppaX* de *BV*, par recombinaison homologue. Le *pSW23T* est dotée d'un gène codant la résistance au chloramphénicol, sans oublier que c'est un plasmide suicide. Il ne peut donc se répliquer qu'en présence de la protéine λ pir. Le *pSW23T* recombinant obtenu servira à la transformation de la souche *E.coli DH5 α λ pir*, puis de *BV* sensible au chloramphénicol. Ce gène *ppaX* tronqué s'intégrera dans le génome de *BV* par recombinaison homologue. La souche *BV* obtenue serait mutée au niveau du gène *ppaX*, la résistance de cette souche à la salinité serait testée afin de conclure si la totalité du gène *ppaX* est impliquée dans la résistance à la salinité chez *BV* (**Figure 22**).

Construction d'une souche de *B. Velezensis* mutée du gène *ppax*

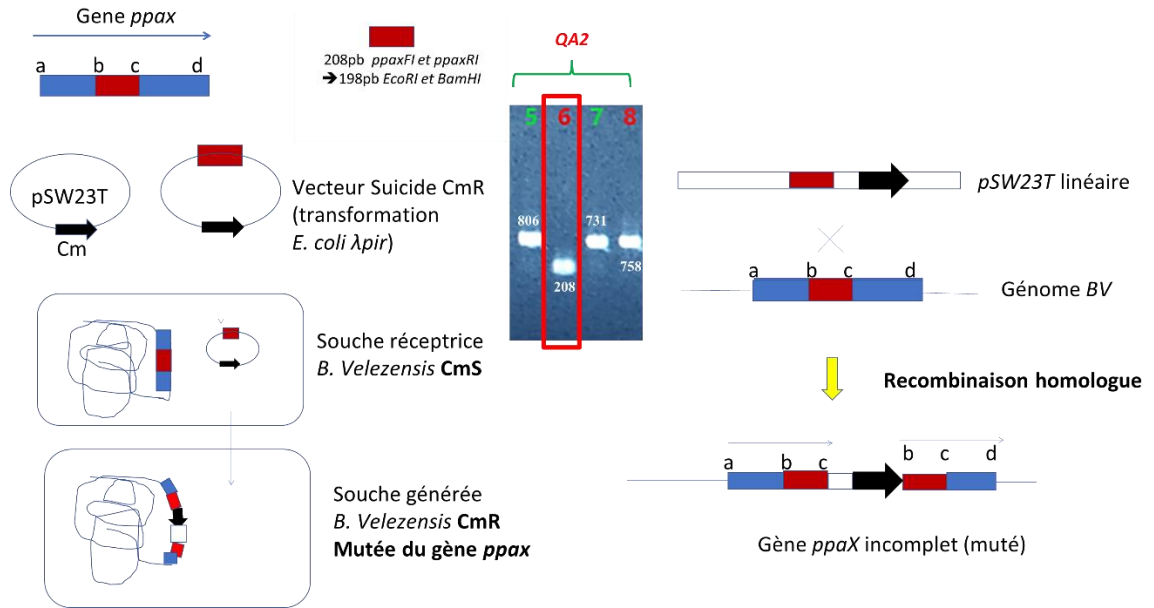


Figure 22: Stratégie de la construction d'une souche BV mutée du gène *ppax*

Dans le but de vérifier les résultats obtenus, une expérience de transformation de cette nouvelle souche *BV* par le *pUC19* contenant le gène *ppaX* pourrait être réalisée. Ce *pUC19* recombinant se répliquerait et permettrait la restauration du phénotype, c-à-d, la résistance de *BV* à la salinité.

- La 3^{ème} construction concerne le clonage du gène *ppaX* de *BV* dans le plasmide *pGEX4T2*, dans le but de transformer *E.coli* et produire la pyrophosphatase fusionnée à la protéine *GST* (Schäfer et al., 2015), qui sera, par la suite, purifiée sur colonne glutathion puis éluée avec glutathion réduit (**Figure 23**).

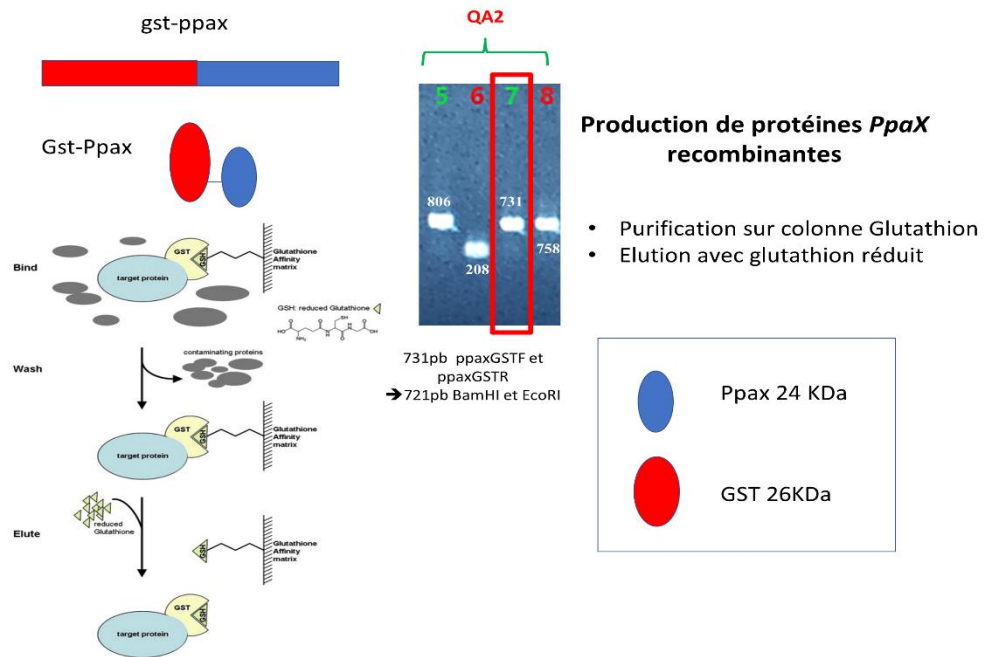


Figure 23: Stratégie de la 3ème construction de clonage

4. La 4^{ème} construction est le *pUC19* recombinant contenant le gène *ppaX* entier de *BV*. Cette construction vise à produire la *Ppase BV* fusionnée au motif 6 Hist (Singh & Jain, 2013), dans le but de purifier la *Ppase* sur colonne de Nickel et l'éluer avec imidazole (**Figure 24**).

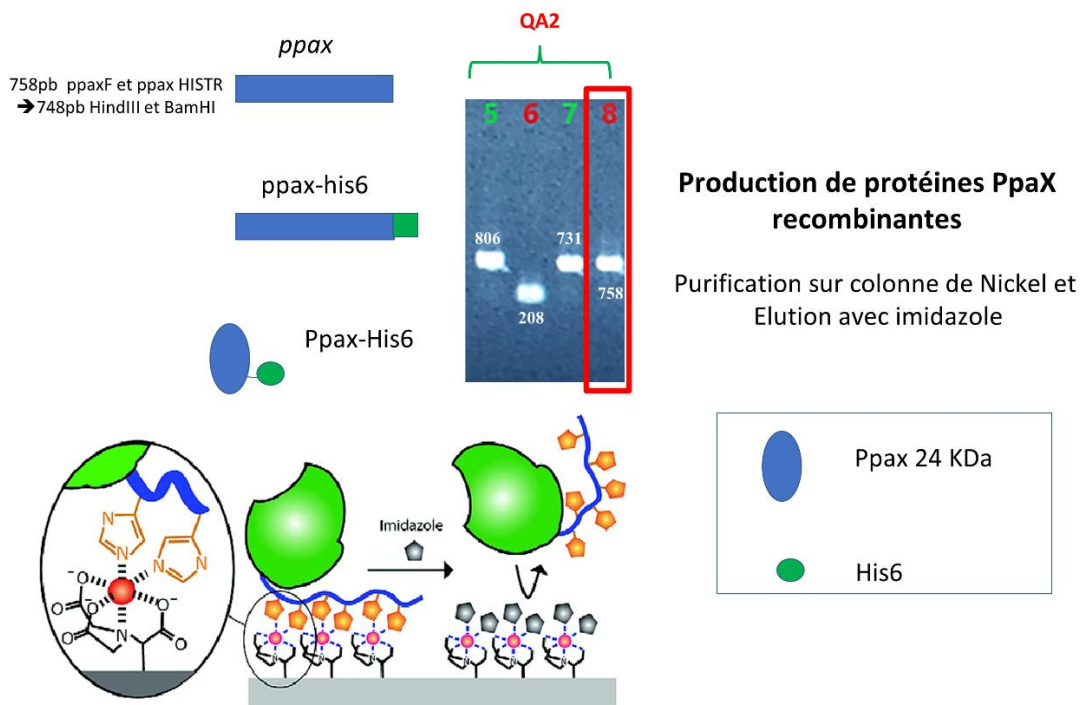


Figure 24: Stratégie de la 4ème construction de clonage

Ces deux dernières constructions (**Figure 23, Figure 24**) visant la production et la purification de *Ppase* fusionnée soit à la GST soit aux 6Hist ont pour objectif, la surexpression des *Ppases*

recombinantes et la production d'anticorps spécifiques, par immunoprécipitation ou par coprécipitation, dans le but d'étudier les interactions protéiques de la pyrophosphatase.

RESULTATS & DISCUSSION

IV. RESULTATS

IV.1. Culture bactérienne

Bacillus velenzensis, *Bacillus liqueniformis* et *E.coli DH5α* ont été mises en culture sur un milieu TSA ; alors que *E.coli DH5α : pUC19* et *E.coli DH5α::pGEX4T2* ont été cultivées sur un milieu TSA contenant de l'ampicilline (50 mg/ml), afin de maintenir les plasmides portant le gène *bla* qui confère la résistance à l'ampicilline. La **Figure 25** illustre l'aspect des colonies.

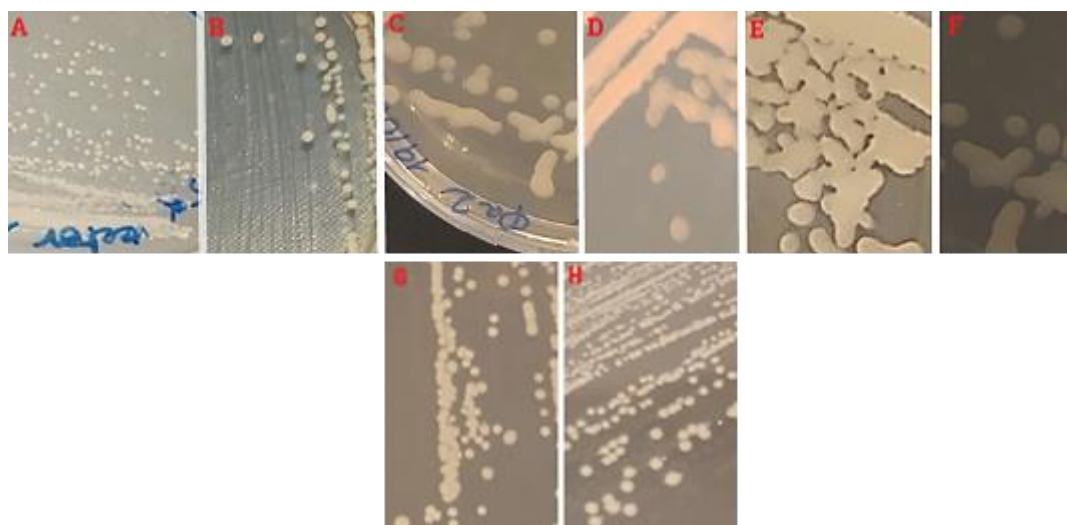


Figure 25: Aspects des colonies des différentes souches bactériennes cultivées

A: DH5α , B: QA1, C: QA2 , D: Z16 , E: DN59 , F: DN74 , G: DH5α ::pUC19, H:DH5α::pGEX4T2 .

IV.2. Criblage des souches résistantes à la salinité

Pour évaluer la tolérance bactérienne des 4 souches *BV* à la salinité (différentes concentrations de NaCl), et vérifier si l'origine de ces souches influence leur résistance à la salinité ; un test de salinité a été effectué sur milieux solide et liquide, en utilisant comme contrôle négatif *E.coli DH5α* et *B.lyqueniformis QA1*, comme contrôle positif .

IV.2.1. Milieu solide :

Les résultats du test de salinité sur milieu solide (**Figure 26**) ont montré qu'à l'exception de *E.coli DH5α*, toutes les souches *QA1*, *QA2*, *Z16*, *DN59*, *DN74*, ont poussé sur les milieux TSA additionnés de NaCl (3% et 5%). La souche *QA2* a eu une faible croissance sur TSA à 8%

NaCl ; alors qu'aucune croissance bactérienne n'a été observée sur les milieux TSA à 12% et 15% de NaCl.

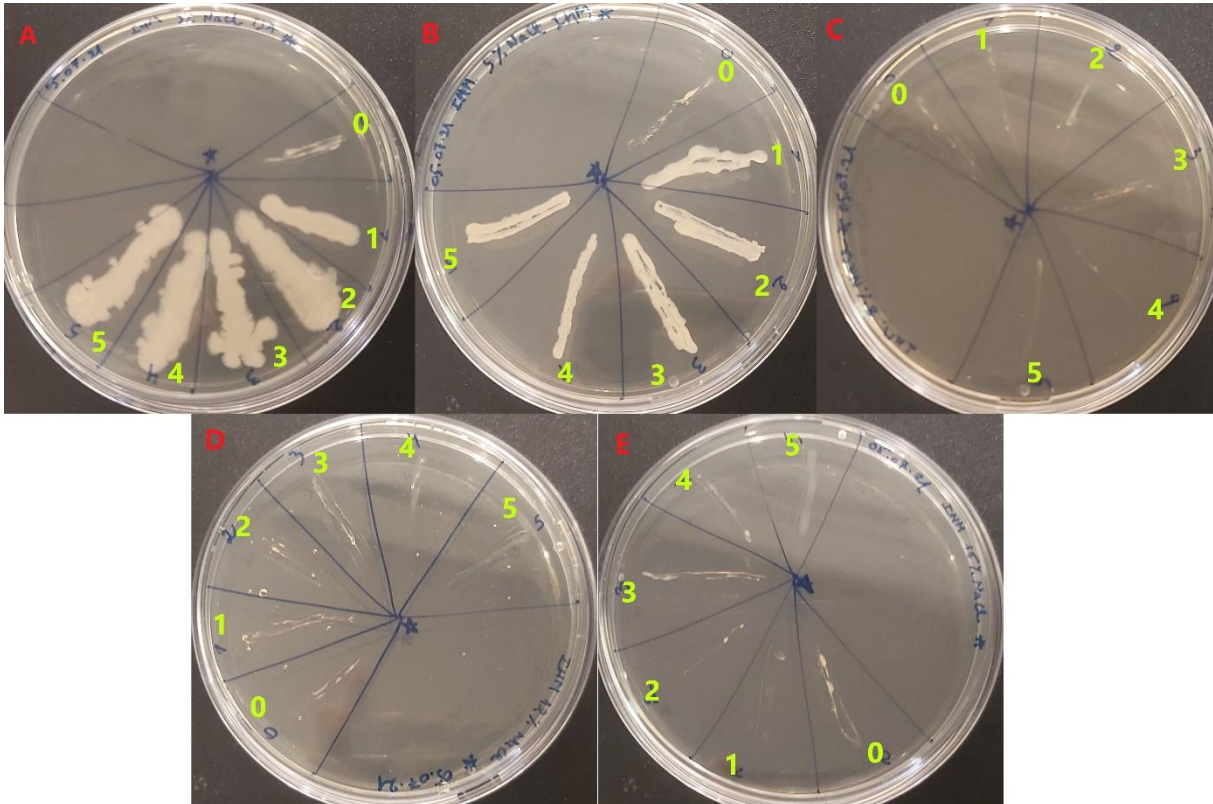


Figure 26 : Résultats du test de salinité sur milieu solide

A : TSA+ 3% NaCl, **B** : TSA+ 5% NaCl, **C** : TSA+ 8% NaCl, **D** : TSA+ 12% NaCl, **E** : TSA+ 15% NaCl, **0** : *DH5α* , **1** : *QA1*, **2** : *QA2*, **3** : *Z16*, **4** : *DN59*, **5** : *DN74*

IV.2.2. Milieu liquide :

Les valeurs de la DO_{600} obtenues chaque 2 h, pendant 24 h, ont été analysées par Excel. Les moyennes et les écart-types des triplicatas ont été établis et présentés sous-forme de courbes de croissance pour chaque souche, dans les différentes concentrations de NaCl.

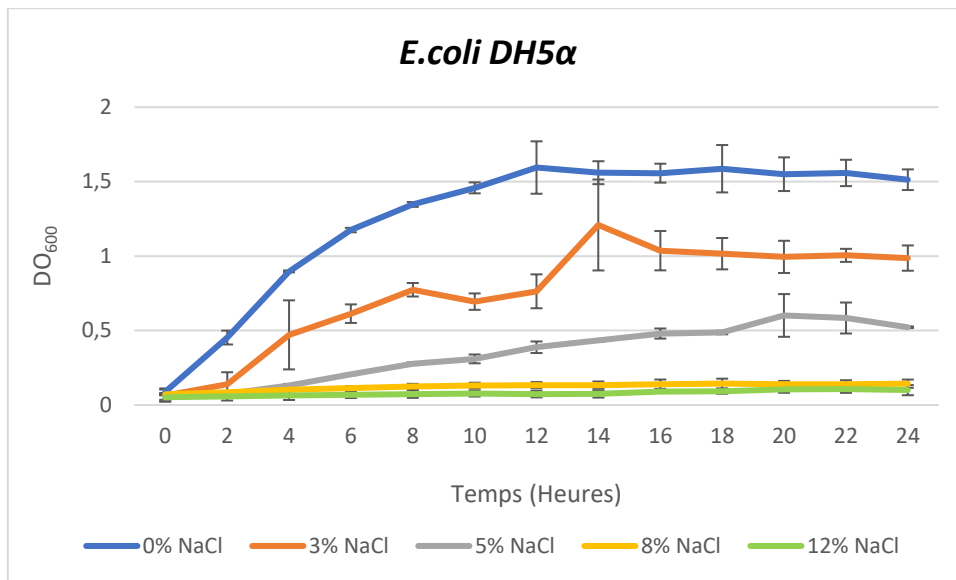


Figure 27: Courbes de croissance de la souche bactérienne *E.coli DH5α* sur milieux TSB à différentes concentrations de NaCl

La **Figure 27** montre qu'en l'absence de NaCl, *E.coli DH5α* a atteint la phase stationnaire pour une DO_{600} maximale égale à 1,59, après 12 h d'incubation. Dans un milieu enrichi de 3% de NaCl, *E.coli DH5α* a atteint la phase stationnaire, avec une DO_{600nm} de 1,03 seulement ; alors que dans un milieu enrichi de 5% de NaCl, la phase stationnaire a été atteinte pour une valeur de DO_{600nm} de 0,6. Il est à remarquer que :

- Aucune croissance de ces bactéries n'a été observée à 8% ni à 12% de NaCl.
- Si *E.coli DH5α* a toléré une concentration de 3% en NaCl, elle s'est développée difficilement en présence de 5% de NaCl et pas du tout à 8% ni à 12%.

En conclusion, la croissance de cette souche a été réduite par les faibles concentrations de NaCl et complètement anéantie par les fortes concentrations de ce sel.

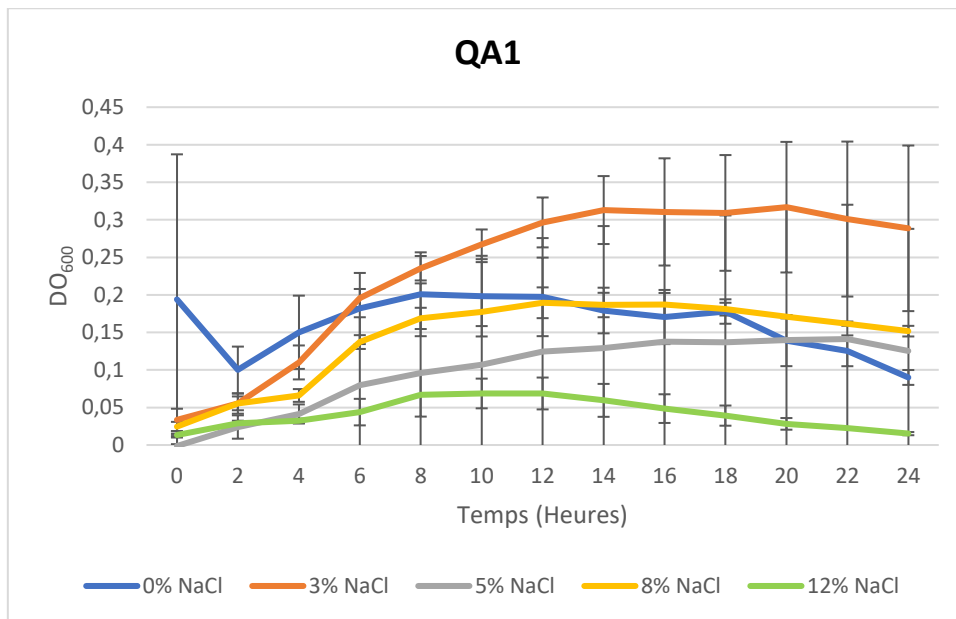


Figure 28: Courbes de croissance de la souche bactérienne *QA1* sur milieux TSB à différentes concentrations de NaCl

La **Figure 28** montre l'effet des différents teneurs de NaCl sur la croissance de *QA1*.

Dans un milieu dépourvu de NaCl, la croissance de la souche *QA1* a été faible, avec une DO de 0,2 et son déclin a été très rapide ; alors qu'en présence d'une concentration de 3% en NaCl, dans le milieu de culture, cette croissance a augmenté avec une DO_{600nm} de 0,3 ; en plus ces bactéries ont été maintenues longtemps en vie (phase stationnaire). Aux concentrations supérieures (5%, 8% et 12%) de NaCl, la croissance s'est ralentie avec des valeurs de DO_{600nm} , inférieures à 0,2 : ces résultats suggèrent qu'à faible teneur, NaCl semblerait induire la croissance de *QA1*.

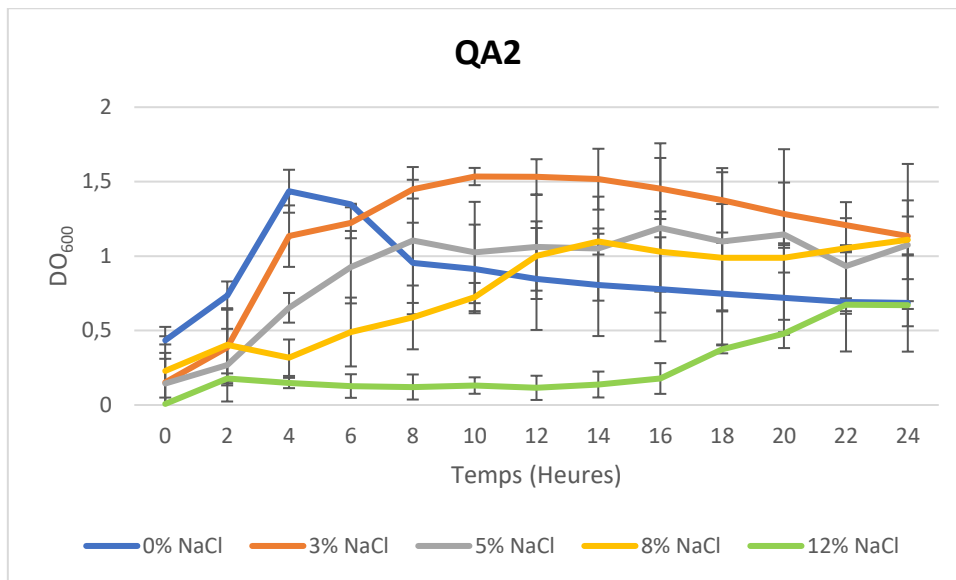


Figure 29: Courbes de croissance de la souche bactérienne QA2 sur milieux TSB à différentes concentrations de NaCl

Dans la **Figure 29**, il a été observé que sans sel, QA2 est arrivée à croître rapidement avec une DO_{600nm} maximale de 1.3, une phase stationnaire restreinte et un déclin rapide. Par contre, dans un milieu faiblement riche en NaCl (3%), la croissance de QA2, a été étalée dans le temps, avec une DO_{600nm} maximale de 1.5 et sa phase stationnaire maintenue longtemps.

Dans des milieux plus riches en NaCl, (5%, 8%) , la croissance a démarré difficilement : avec une DO_{600nm} d'environ 1.1, mais les phases stationnaires ont été maintenues ; signe que QA2 tolérerait des concentrations moyennes en NaCl et s'y adapterait rapidement, en synthétisant les enzymes et métabolites nécessaires à sa survie. la croissance de QA2 a mis trop de temps pour décoller (phase de latence allongée), confirmant que QA2 n'a pas toléré les fortes concentrations en NaCl, mais s'adapterait probablement au stress salin.

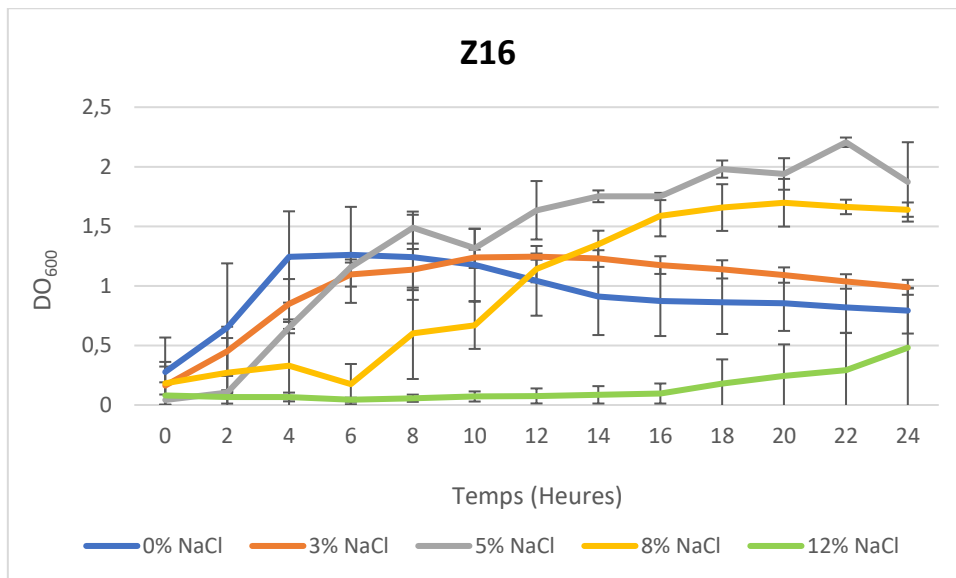


Figure 30: Courbes de croissance de la souche bactérienne Z16 sur milieux TSB à différentes concentrations de NaCl

A partir de la **Figure 30**, il est à remarquer que : sans NaCl, la souche Z16 et après une brève croissance pour une DO_{600nm} de 1.26 a atteint rapidement le déclin, probablement par manque de nutriments. Dans un milieu contenant 3% de NaCl, la croissance et la survie de Z16 ont été maintenues plus longtemps. Ce sel favoriserait donc la croissance et la survie de cette bactérie.

A des concentrations de 5% et 8%, la croissance de la souche Z16 a été boostée avec des valeurs de DO_{600nm} supérieures à 2 et 1.5 respectivement. Les phases stationnaires maintenues expliquent l'intérêt de NaCl pour la survie des bactéries. Quant à la concentration 12% de NaCl, elle constitue un stress abiotique puissant ; les bactéries avaient besoin (phase de latence très allongée : 22 h) afin de produire les enzymes et métabolites adéquats et surmonter le choc osmotique.

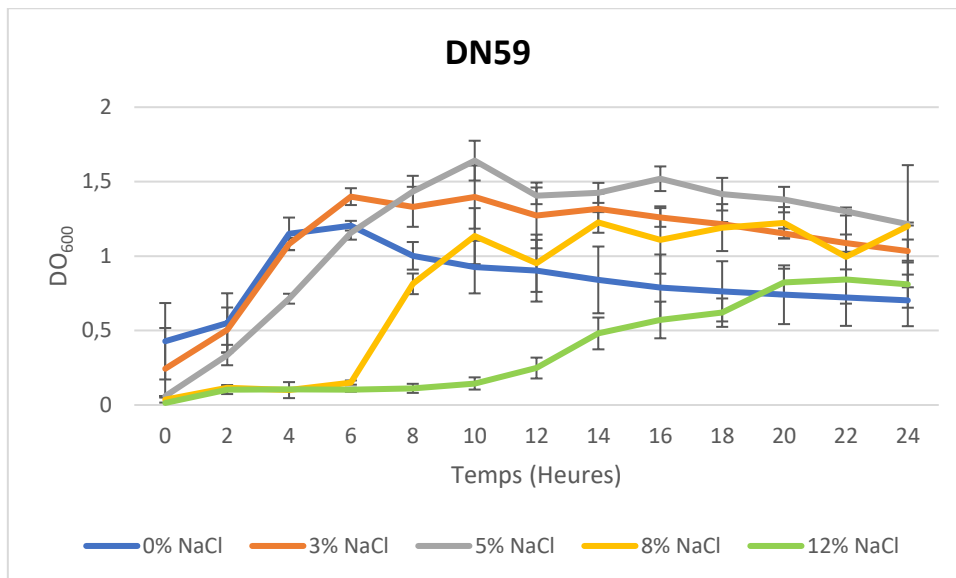


Figure 31: Courbes de croissance de la souche bactérienne *DN59* dans le milieu TSB à différentes concentrations de NaCl

La **Figure 31** montre qu'à 0% de NaCl, les bactéries *DN59* ont poussé faiblement ($DO_{600nm} = 1.2$), avec une phase stationnaire courte et un déclin rapide. Dans un milieu enrichi de NaCl (3%), la croissance de cette souche a été améliorée avec une DO_{600nm} de 1.4 et une phase stationnaire maintenue plus longtemps. En présence de 5% de NaCl, les bactéries ont eu une forte croissance ($DO_{600nm} = 1.64$), avec une phase stationnaire persistante, symbole d'une meilleure survie. Sous une concentration de 8% de NaCl, la croissance de *DN59* a tardé au début, pour bien se lancer après, en plus les bactéries ont survécu longtemps, confirmant l'intérêt du sel dans leur développement. La concentration de 12% en NaCl a soumis les bactéries à un stress osmotique important, les obligeant à s'adapter lentement, puis à retrouver leur croissance.

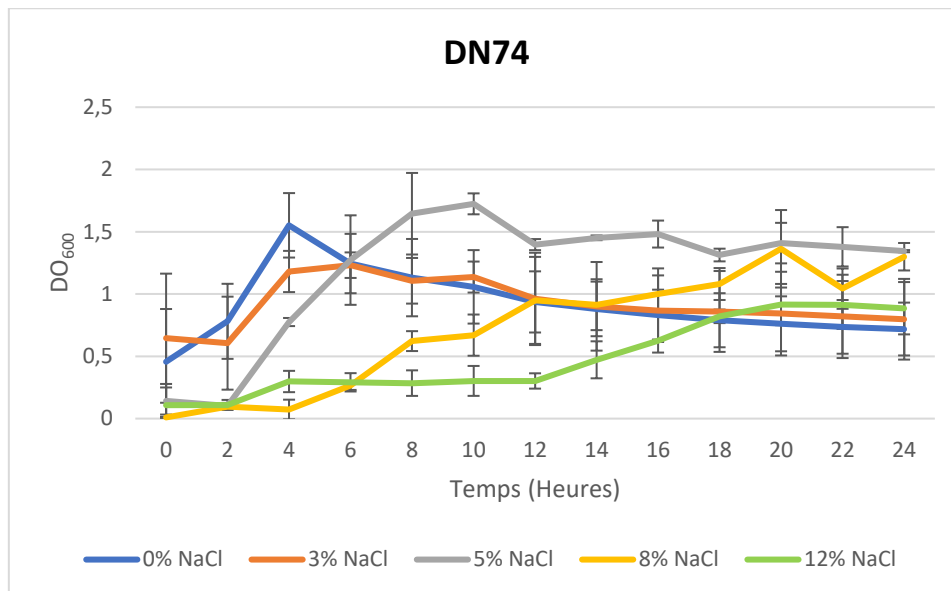


Figure 32: Courbes de croissance de la souche bactérienne *DN74* sur milieux TSB à différentes concentrations de NaCl

Dans la **Figure 32** et en l'absence de NaCl, malgré une croissance rapide et importante, la souche *DN74* est, vite, arrivée au déclin. Sous une concentration de 3% de NaCl, les bactéries ont survécu plus longtemps qu'avant (phase stationnaire allongée). Dans un environnement composé de 5% de NaCl, les bactéries *DN74* ont eu une croissance améliorée (DO_{600nm} de 1.55) et une survie prolongée (phase stationnaire plus longue) ; l'apport de sel a été bénéfique. Avec un apport de 8% de NaCl, cette souche est arrivée à s'adapter, sa croissance a décollé légèrement en retard ; mais sa survie a été maintenue. Dans un milieu enrichi de 12% de NaCl, la croissance de ces bactéries a mis beaucoup de temps avant de démarrer et leur survie a été soutenue ; probablement, ce temps est nécessaire pour qu'elles synthétisent leurs enzymes et métabolites, puis faire face à ce stress abiotique.

La croissance de *QA1* et *QA2* a été favorisée dans un milieu de faible salinité (3% de NaCl) ; mais pour un taux de sel supérieur (5%, 8% et même 12%) et alors que la croissance de *QA1* est ralentie puis s'est arrêtée ; celle de *QA2* a continué son augmentation : probablement, parce que *QA2* s'adapterait mieux en mobilisant ses enzymes et métabolites afin de résister au stress salin. Les bactéries *ZI6*, *DN59* et *DN74* ont toléré les faibles taux de NaCl, leur croissance a été particulièrement et fortement induite en présence de 5% de NaCl. Ces 3 souches ont résisté aux concentrations élevées en sel, mais s'y seraient adaptées plus ou moins vite, moyennant un arsenal d'enzymes et de métabolites compatibles ; face à ce stress.

IV.3. Extraction du génome bactérien

L'électrophorèse a montré que les ADNs extraits ont été d bonnes qualité. Des bandes de grandes tailles moléculaires correspondant à l'ADN génomique sont visibles sur le gel, dans chaque puit (Figure 33).

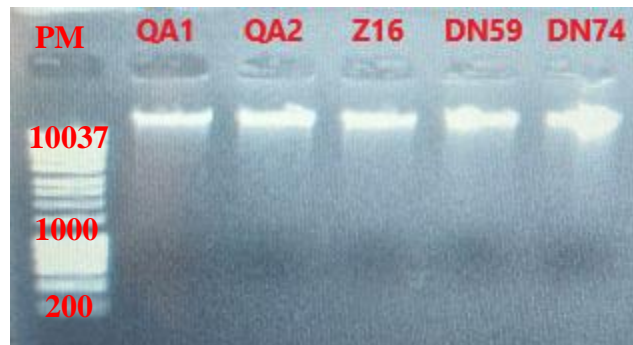


Figure 33: Electrophorèse sur gel d'agarose 0.7% de 5 microlitres/ 50 microlitres du volume total d'ADN génomique des 5 souches bactériennes *Bacillus* (QA1, QA2, Z16, DN59, DN74)

IV.4. Amplification par PCR (Polymerase Chain Reaction)

Trois microlitres des produits de PCR ont été déposés sur un gel d'agarose, à 0,7%, pour réaliser une électrophorèse. Les tailles des produits de PCR ont été compatibles avec celles attendues, *In Silico*, par le logiciel SnapGene (Figure 34).

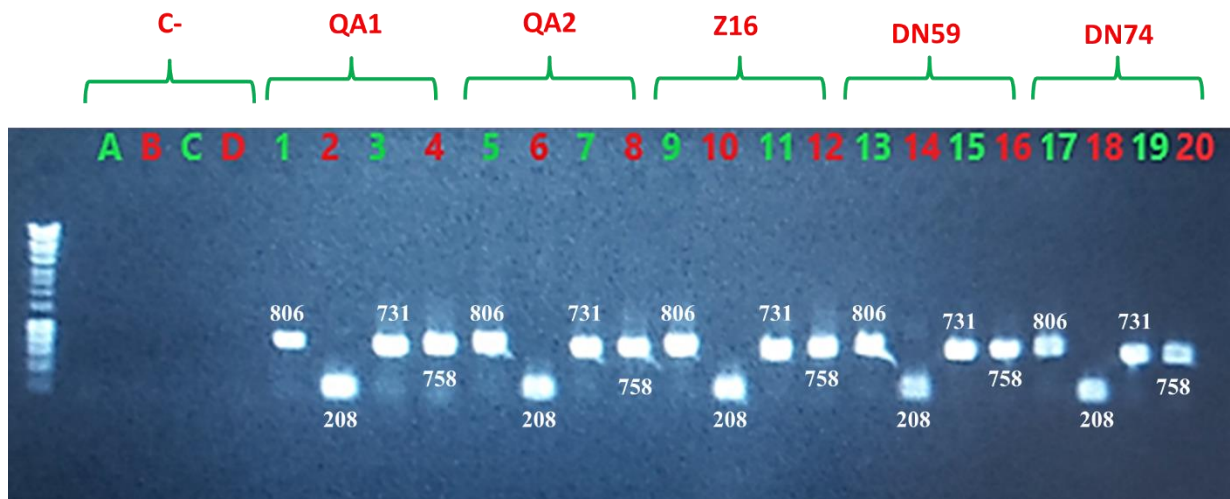


Figure 34: Electrophorèse de 3 microlitres / 25 microlitres du volume total des produits de PCR du gène *ppaX* des 5 souches bactériennes de *Bacillus* sur un gel d'agarose 0.7%

| N° de puit | Oligos (For/ Rev) |
|---------------------|------------------------------------|
| A, 1, 5, 9, 13, 17 | <i>ppaxF</i> et <i>ppax RWT</i> |
| B, 2, 6, 10, 14, 18 | <i>ppaxFI</i> et <i>ppaxRI</i> |
| C, 3, 7, 11, 15, 19 | <i>ppaxGSTF</i> et <i>ppaxGSTR</i> |
| D, 4, 8, 12, 16, 20 | <i>ppaxF</i> et <i>ppax HISTR</i> |

Il est à noter qu'aucune bande n'a été détectée au niveau des puits « contrôle négatif » (A, B, C et D), ce qui signifie l'absence des contaminations (**Figure 34**). L'amplification du gène *ppaX* entier (environ 806-pb (**Figure 49, Figure 50**)) par les amorces *ppaxF* et *ppax RWT*, au niveau des puits 1, 5, 9, 13 et 17 signifie, les 5 souches bactériennes de *Bacillus* (*QA1, QA2, Z16, DN59 et DN74*) ont le gène *ppaX* (**Figure 34**).

Les produits de PCR déposés dans les puits 2, 6, 10, 14 et 18, issus de l'amplification du fragment interne du gène *ppax*, par les oligonucléotides *ppaxFI* et *ppaxRI* sont d'une taille similaire à celle prévue par le logiciel SnapGene, d'environ 208-pb (**Figure 34, Figure 51, Figure 52**).

Au niveau des puits 3, 7, 11, 15 et 19, la taille des produits PCR est d'environ 731-pb. Ils résultent de l'amplification du gène *ppax*, effectuée par les amorces *ppaxGSTF* et *ppaxGSTR* (**Figure 34, Figure 53, Figure 54**).

Les oligonucléotides *ppaxF* et *ppax HISTR* ont été utilisés pour amplifier le gène *ppaX* auquel 6 codons de l'histidine ont été greffées à sa partie C-terminale. La taille attendue est d'environ 758-pb (**Figure 34, Figure 55, Figure 56**).

IV.5. Séquençage sanger et Alignement des séquences nucléotidiques des produits du séquençage

L'alignement des séquences nucléotidiques des produits de PCR a été réalisé, pour évaluer la conservation des bases nucléotidiques du gène *ppaX* entre les différentes souches bactériennes de *B. velezensis*. Le contrôle qualité des chromatogrammes et la correction des produits du séquençage sanger ont été effectués par BioEdit. Les produits de séquençage du gène *ppaX* de la souche *QA1* étant de très mauvaise qualité, ont été exclus de la suite du processus du traitement. Les Reads Forward et Reverse de chaque séquence ont été alignés. La séquence consensus a été bien révélée. Et l'alignement de toutes les séquences consensus a été réalisé trois fois, par différents programmes : ClustalW Multiple Alignment de BioEdit (**Figure 35**) (Sanchez-Villeda et al., 2008), Clustal Omega Multiple Alignment (Sievers & Higgins, 2014) (**Figure 57**), et TCOFFEE Multiple Alignment (Notredame et al., 2000) (**Figure 58**).

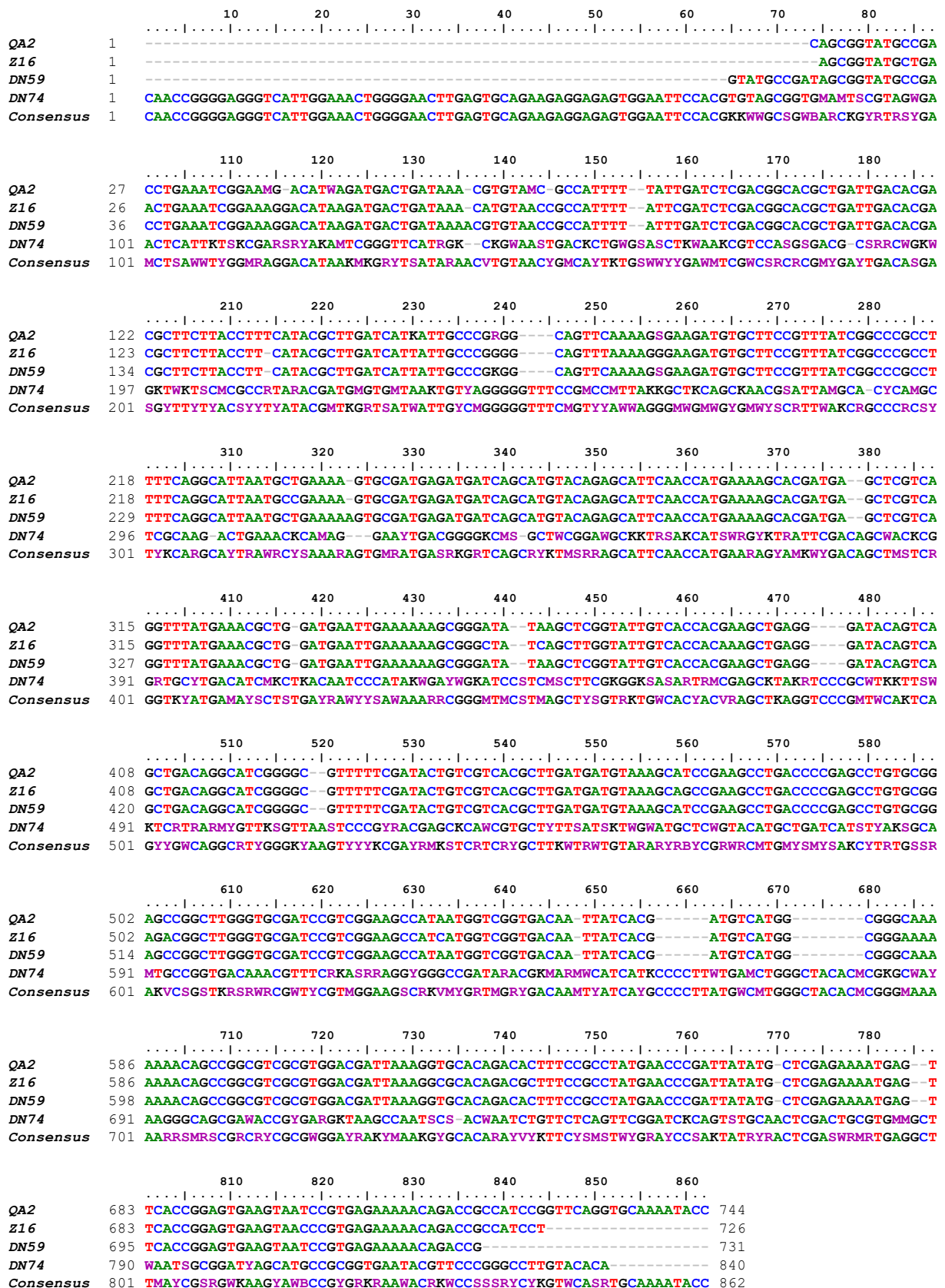


Figure 35: Alignement des séquences du gène *ppaX* des quatre souches de *B. velezensis* (QA2, Z16, DN59 et DN74) par BioEdit Cluster W Multiple Alignment

Il est à noter que la séquence nucléotidique du gène *ppaX* a été conservée dans sa majorité, chez les 4 souches bactériennes ; elle serait indispensable à l'expression du gène et à sa fonction. La séquence nucléotidique de *DN74* paraît plus longue que les 3 autres.

IV.6. Traduction des produits de séquençage et Alignement protéique

Après identification des phases de lecture ouvertes avec le programme ExPASy Translation Tools (Gasteiger et al., 2003), les produits de séquençage du gène *ppaX* des souches *QA2*, *Z16* et *DN59* ont été traduits en acides aminés. Les séquences protéiques de la pyrophosphatase, codée par l'*ORF pSR8* (Mirete et al., 2015; *Uncultured Bacterium Clone PSR8 Putative Sodium Transporter Gene, Partial Cds*, 2015), les séquences protéiques des *PPases* de *B. subtilis* (pyrophosphatase [*Bacillus subtilis*] - Protein - NCBI, s. d.), des *Ppases B.velezensis* (pyrophosphatase [*Bacillus velezensis*] - Protein - NCBI, s. d.) puis les séquences peptidiques des *Ppases* de *QA2*, *Z16* et *DN59* ont été alignées par le biais de trois programmes : Clustal Omega (Sievers & Higgins, 2014) (Figure 59), BioEdit (Sanchez-Villeda et al., 2008) (Figure 36) et TCoffee Expresso (Armougom et al., 2006) (Figure 60).

Ci-dessous (Figure 36) les résultats des alignements protéiques.

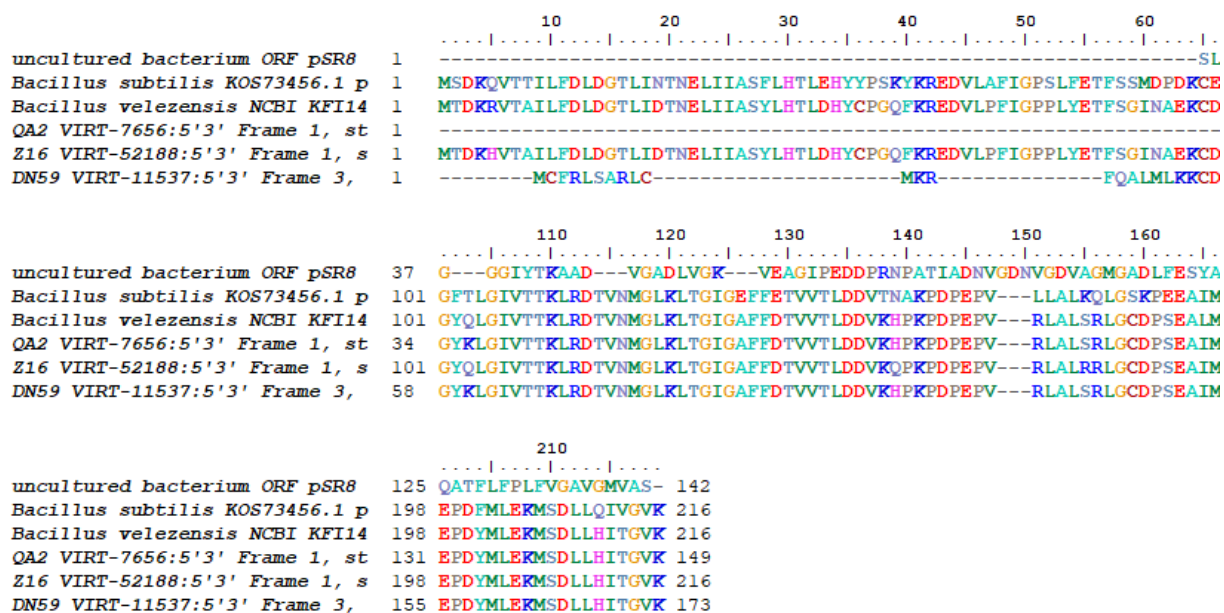


Figure 36: Alignement des séquences protéiques *PPase* codée par l'*ORF pSR8* et celles des souches de *B.subtilis*, *B.velezensis*, *QA2*, *Z16* et *DN59* par ClustalW de BioEdit

Cet alignement montre que la majorité des acides aminés des *PPases* sont conservés, essentiellement chez *B.subtilis*, *B.velezensis*, *QA2*, *ZI6* et *DN59*. Ces acides aminés seraient indispensables à la fonction de la pyrophosphatase. Les séquences peptidiques des *Ppases* des souches *B. subtilis*, *B.velezensis*, *QA2*, *ZI6*, *DN59* sont longues (216 AAs en moyenne), contrairement à la séquence protéique de l'*ORF pSR8* (142 AA) et qui porte 3 AAs GDN, à la position 147, mais qui semble suffisante à l'expression de la fonction protéique (Mirete et al., 2015).

IV.7. Extraction plasmidique

L'électrophorèse (Figure 37) a montré que les ADN plasmidiques sont de bonne qualité. Dans chaque puits, apparaissent les 3 formes du plasmide non digéré : relâchée, circulaire et super enroulé.

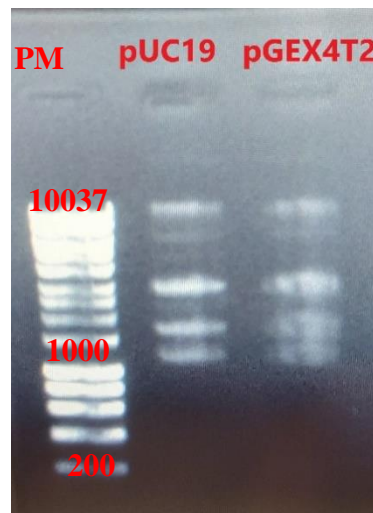


Figure 37: Contrôle qualité de l'extraction plasmidique du *pUC19* et du *pGEX4T2* par électrophorèse sur gel d'agarose (0,7%) en déposant 3 microlitres sur 50 microlitres des plasmides extraits dans chaque puits

IV.8. Digestion enzymatique

Le *pUC19* (puits N°1, 3), le produit de PCR du gène *ppaX*, amplifié par les amorces *ppaxF* et *ppax RWT* (puits N°4) et celui amplifié par les amorces *ppaxF* et *ppax HISTR* (puits N°4) ont été digérés par *HindIII* et *BamHI*. Le *pGEX-4T-2* (puits N°2), le produit PCR du gène *ppax*, amplifié par les amorces *ppaxFI* et *ppaxRI* (puits N°5) ainsi que celui résultant de la PCR par les oligonucléotides *ppaxGSTF* et *ppaxGSTR* (puits N°6) ont été digérés par *EcoRI* et *BamHI*. La Figure 38 montre les tailles des produits de digestions obtenus.

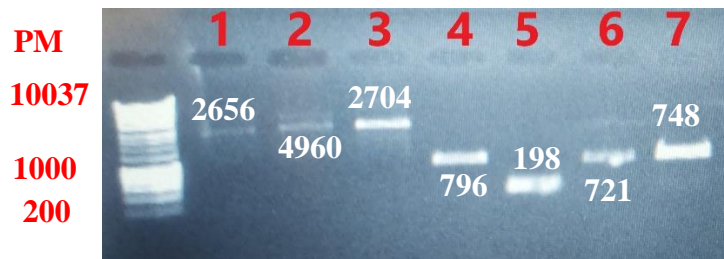


Figure 38: Contrôle qualité des doubles digestions enzymatiques par gel d'électrophorèse 0.7% en déposant 3 microlitres des produits de digestion dans chaque puit

1 :*pUC19* digéré par *HindIII* et *BamHI*, **2** :*pGEX4T2* digéré par *BamHI* et *EcoRI*, **3** : *pUC19* digéré par *HindIII* et *BamHI*, **4** :Produit PCR *ppaX*, amplifié par les amorces *ppaxF* et *ppax RWT*, digéré par *HindIII* et *BamHI*, **5** :Produit PCR *ppaX*, amplifié par les amorces *ppaxFI* et *ppaxRI*, digéré par *EcoRI* et *BamHI*, **6** :Produit PCR *ppaX*, amplifié par les amorces *ppaxGSTF* et *ppaxGSTR*, digéré par *BamHI* et *EcoRI*, **7** :Produit PCR *ppaX*, amplifié par les amorces *ppaxF* et *ppax HISTR*, digéré par *HindIII* et *BamHI*.

IV.9. Ligation et tentative de clonage

Après la double digestion enzymatique, une tentative de clonage a été réalisée *In Silico* par le logiciel SnapGene et *In Vitro*, en utilisant le kit *Quick Stick Ligase de Bionline*. Le plasmide recombinant *pUC19::ppaxWTR* (**Figure 39**) a été obtenu en réalisant la ligation des produit de digestion (*pUC19* et produit PCR *ppaX*, amplifié par les amorces *ppaxF* et *ppax RWT* digérés par *HindIII* et *BamHI*)

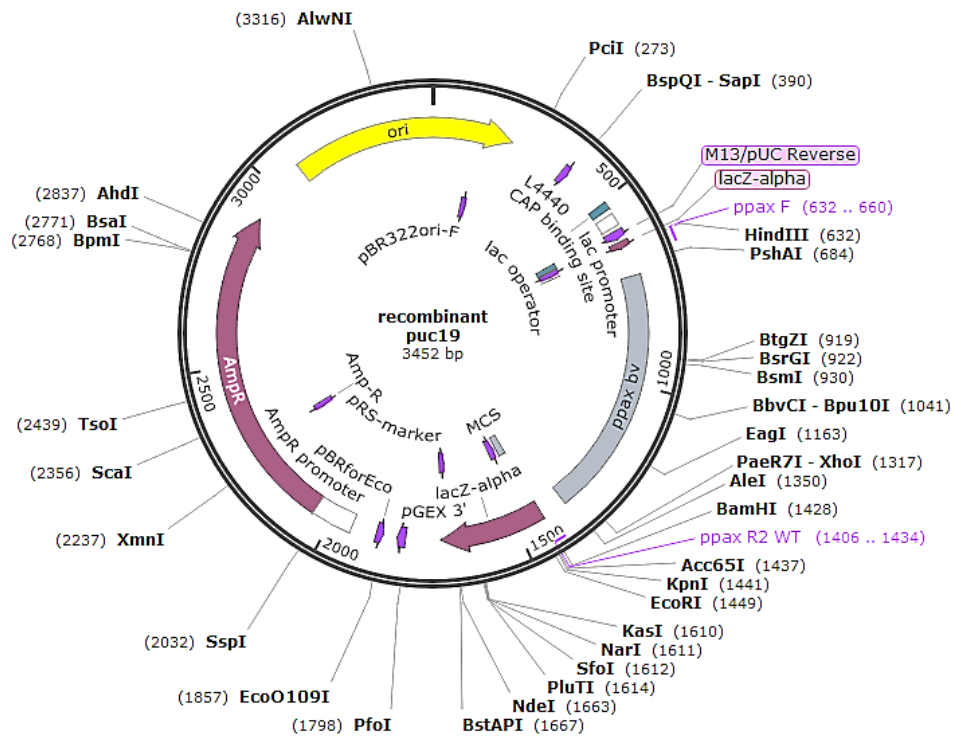


Figure 39: Carte de restriction du plasmide recombinant, construit in-silico : *pUC19::ppaxWTR*

Le plasmide recombinant *pSW23T::ppax interne* (Figure 40) a été construit par ligation des produit de digestion (*pSW23T* et le produit de PCR *ppax*, amplifié par les amorces *ppaxFI* et *ppaxRI* digérés par *EcoRI* et *BamHI*)

Le plasmide recombinant *pUC19::ppaxWTR* (Figure 42) a été obtenu en effectuant la ligation des produit de digestion (*pUC19* et produit PCR *ppaxX*, amplifié par les amorces *ppaxF* et *ppax RWT* et digérés par *HindIII* et *BamHI*)

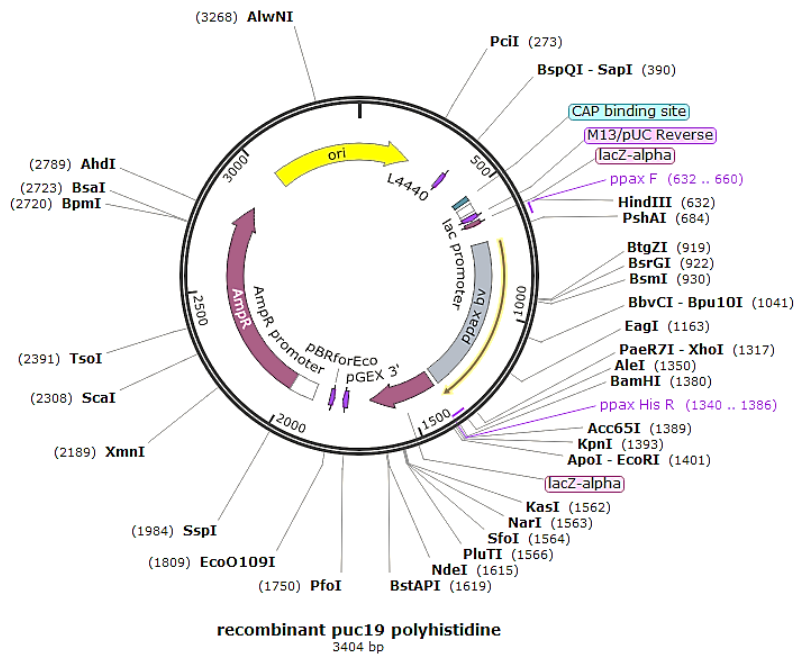


Figure 42: Carte de restriction du plasmide recombinant, construit : *pUC19::ppaxHIST*

IV.10. Transformation de *E.coli DH5α* et Calcul de l'efficacité de transformation

Aucune colonie n'a été détectée ni dans le milieu de culture (TSA+ Ap)ensemencé par les cellules *Ecoli DH5α* transformées par le *pUC19 recombinant*, ni dans celui ensemencé par les cellules *Ecoli DH5α* transformées par le *pGEX4T2 recombinant*. Cependant, 7 colonies de *E.coli DH5α::pUC19 non recombinant* sont apparues sur milieu TSA additionnée d'ampicilline (contrôle Positif) (Figure 43).

L'efficacité de transformation a été calculée comme suit :

$$\text{l'efficacité de transformation} = \frac{\text{nombre de colonies transformées}}{\mu\text{g de plasmide étalés sur boîte de pétri}}$$

On a : la concentration du *pUC19*= 0,108 μg/μl

Vingt μl du plasmide ont été ajoutés aux cellules compétentes.

Donc : 20 μl x 0,108 μg/μl =2,16 μg est la quantité de plasmide ajoutée au début de l'expérience.

La fraction du plasmide étalée sur le milieu TSA enrichi par 50mg/ml de l'ampicilline est calculée : $\frac{\text{volume par lequel estensemencé la boîte de pétri}}{\text{volume totale du milieu+cellules compétentes+plasmide}} = \frac{420 \mu\text{l}}{520 \mu\text{l}} = 0,8$

En conséquence, la quantité de l'ADN plasmidique étalée est : $2,16\mu\text{g} \times 0,8 = 1,728\mu\text{g}$ de *pUC19*.

Et sachant qu'uniquement 7 colonies *E.coli DH5α ::pUC19* ont été apparues (**Figure 43**). Donc, l'efficacité de cette transformation est :

$$\text{l'efficacité de transformation} = \frac{7 \text{ transformants}}{1,728 \mu\text{g de } pUC19} = 4 \text{ transformants}/\mu\text{g d'ADN}$$

La faible efficacité de transformation de *E.coli DH5α*, a montré que les cellules chimio-compétentes n'étaient pas assez compétentes. Ceci pourrait expliquer en partie, pourquoi il n'y a pas eu de clones dans les autres expériences de transformations de *E.coli DH5α* par le *pUC19* et le *pGEX4T2* recombinants.

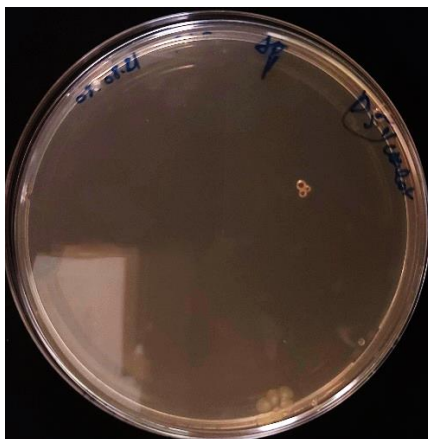


Figure 43: Résultat de la transformation de *DH5α :: pUC19*, sur milieu TSA additionné d'ampicilline

IV.11. Transformation de *Bacillus velezensis QA2* par le *pUC19* et Calcul de l'efficacité de transformation

Trois colonies de *QA2::pUC19* ont poussées sur le milieu TSA+Apensemencé par 100 μl des bactéries transformées. Et environ 13 colonies *QA2::pUC19* sont apparues sur le milieuensemencé par le culot de 420 μl de la solution des cellules transformées, après centrifugation (**Figure 44**).

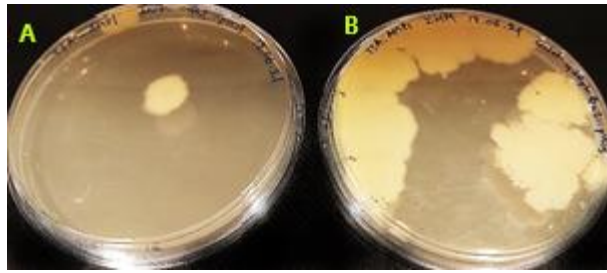


Figure 44: Résultat de la transformation de *QA2::pUC19*, sur milieu TSA additionné d'ampicilline

L'efficacité de transformation est calculée comme suit :

$$\text{l'efficacité de transformation} = \frac{\text{nombre de colonies transformées}}{\mu\text{g de plasmide étalés sur boîte de pétri}}$$

On a : la concentration du *pUC19* = 42,114 ng/μl

Vingt μl de plasmides ont été ajoutés aux cellules compétentes.

Donc : 20μl x 42,114ng/μl = 840 ng est la quantité de plasmide ajoutée au début de l'expérience.

La fraction du plasmide étalée sur le milieu TSA enrichi par 50mg/ml de l'ampicilline est

$$\text{calculée : } \frac{\text{volume par lequel estensemencé la boîte de pétri}}{\text{volume totale du milieu+cellules compétentes+plasmide}} = \frac{420 \text{ ml}}{520 \text{ ul}} = 0,8$$

La quantité d'ADN plasmidique étalée est: 0,84μg x 0,8 = 0,672μg du *pUC19*.

Et sachant que 13 colonies *QA2 ::pUC19* sont apparues sur le milieuensemencé, l'efficacité de cette transformation est:

$$\text{l'efficacité de transformation} = \frac{13 \text{ transformants}}{0,672 \mu\text{g de } pUC19} = 19,4 \text{ transformants}/\mu\text{g d'ADN}$$

V.DISCUSSION

Les milieux hypersalins comptent parmi les environnements extrêmes, abritant une communauté microbienne diverse. Généralement, les microorganismes halophiles maintiennent l'équilibre osmotique entre leur milieu intra et extracellulaire en optant pour l'une des deux stratégies suivantes :

1/ Le « salt in cytoplasm » en augmentant la concentration du sel (KCl) dans leur cytoplasme. Les ions K⁺ neutralisent la charge négative des enzymes cytoplasmiques réduisant ainsi les forces répulsives et maintenant par conséquent la structure native des enzymes (Mirete et al., 2015; Sleator & Hill, 2002).

2/ L'« osmoprotection » en utilisant des solutés dits 'compatibles' (glycine, bétaine et glycérol), agissant comme osmoprotecteurs, induisant la restauration du volume cellulaire et de la pression de turgescence perdue lors du stress osmotique (Mirete et al., 2015; Sleator & Hill, 2002).

Mais peut-être d'autres mécanismes d'halorésistance ne sont pas encore révélés.

Suite aux tests de résistance à la salinité chez les 6 souches : *E.coli DH5α*, *QA1*, *QA2*, *Z16*, *DN59* et *DN74* ; *E.coli DH5α* tolère au maximum 3 % de NaCl et se développe moins en présence de concentrations plus élevées. La souche *QA1* présente une croissance maximale à 3% de NaCl et continue à croître même à faible vitesse à des concentrations supérieures en sel. Ces résultats restent à confirmer, vu la faible croissance de *QA1* dans le milieu TSB qui est un milieu riche. Comparativement à *E.coli DH5α*, les 4 souches *QA2*, *Z16*, *DN59* et *DN74* tolèrent des concentrations élevées de NaCl. Elles atteignent rapidement la phase exponentielle avec une courte phase stationnaire et un déclin rapide, à faibles concentrations de NaCl (0% et 3%). A des concentrations élevées de NaCl (8% et 12%), elles nécessitent une durée de latence remarquable, qui est probablement associée à la production des enzymes et métabolites indispensables à leur survie et arrivent à la phase stationnaire qui dure plus longtemps. A titre de comparaison, une étude très récente avait montré que sur cinquante et une souches de *Bacillus* criblées in vitro pour la tolérance au stress salin, seules quatre souches (*B. licheniformis* TRQ65, *B. subtilis* TSO24, *B. megaterium* TSQ16 et *B. megaterium* TSQ23) ont montré une tolérance à une condition de stress salin élevé (E.C. = 6,8 dS m⁻¹ ou 5% de NaCl) (Ibarra-Villarreal et al., 2021). Dans la présente étude, les 4 souches de *Bacillus velezensis* tolèrent au minimum 5% de NaCl. Ces résultats suggèrent fortement que le NaCl induirait la croissance de

ces bactéries. De façon remarquable, l'ajout de Na^+ dans le milieu de culture semble favoriser la croissance bactérienne de *Bacillus velezensis*, comme en témoigne la prolongation dans le temps de leur phase stationnaire, respectives.

Les résultats de la PCR indiquent que les souches *B.velezensis* contiennent le gène *ppaX*. L'alignement protéique des *PPases*, révèle la conservation des acides aminés des *Ppases*, suggérant leur importance dans le fonctionnement de la pyrophosphatase. A noter que la partie protéique qui confère la résistance à la salinité, décrite dans le travail réalisé par Mirete et al. (2015), a une longueur de 142 acides aminés, ce qui est par conséquent plus courte que nos séquences *PPases*. Ceci suggère que la partie de protéine *PPase* située entre l'acide amine 65 et 216 devrait être suffisante pour conférer le caractère de tolérance à la salinité chez *Bacillus subtilis* ou *velezensis*.

D'après ces résultats, il paraît que le Na^+ pourrait être utilisé par la pyrophosphatase de *Bacillus velezensis*. En effet, des études ont démontré l'existence de *PPases* membranaires, Na^+ *PPases*, chez *Methanosarcina mazei*, *Moorella thermoacetica* et *Thermotoga maritima*, catalysant le transport de Na^+ (Belogurov et al., 2005; Malinen et al., 2007). Cette pyrophosphatase génère un potentiel membranaire tout en transportant le Na^+ . C'est une pompe de sodium électrogène (Baykov et al., 2013). Une autre famille de pyrophosphatase a été découverte chez *Bacteroides vulgatus*, transportant à la fois les protons et le sodium, Na^+ , H^+ *PPase*. (Luoto et al., 2013a). Les Na^+ , H^+ *PPases* ont besoin de Na^+ pour leurs activités d'hydrolyse et de transport et sont ensuite activées par K^+ (Luoto et al., 2013a; Mirete et al., 2015).

Les constructions plasmidiques et les expériences de clonage n'ont pas abouti, faute de temps en grande partie. En effet, plusieurs problèmes techniques ont entravé ces expérimentations (enzymes de restriction, pureté des préparations d'ADN, échec de transformation des cellules compétentes). Il est donc nécessaire de revoir attentivement chacune des étapes de clonage en incluant des contrôles supplémentaires.

**CONCLUSION
&
PERSPECTIVES**

V. CONCLUSION ET PERSPECTIVES

La salinité menace la production agricole et la santé humaine. L'utilisation accrue d'engrais riches en pesticides chimiques dans le but de remédier à ce phénomène, entraîne l'accumulation de composés chimiques résiduels dans l'environnement et le développement de la résistance chez des micro-organismes pathogènes. Afin d'éviter tous ces effets indésirables, il est recommandé d'employer des agents biologiques. *B. velezensis* est considérée comme agent de biocontrôle précieux, pratique et puissant pouvant être exploité comme alternative efficace aux engrais agrochimiques synthétiques.

Ce travail a pour but d'élucider la distribution et la caractérisation du gène *ppaX* codant la pyrophosphatase chez *B. velezensis* qui pourrait lui conférer la résistance à des concentrations élevées de NaCl, en réexpriment ce gène chez *E. coli DH5a*. D'après les tests de salinité réalisés sur les différentes souches de *B. velezensis*, NaCl semble induire la croissance de ces bactéries. Le Na⁺ serait probablement employé par la Na⁺ pyrophosphatase ou la H⁺/Na⁺ pyrophosphatase de *B. velezensis*.

Les résultats montrent la présence des gènes *ppaX* chez les souches étudiées. La comparaison des séquences peptidiques *Ppases* a montré des différences au niveau de certains résidus d'acides-aminés. Il serait judicieux, en disposant du mutant *ppaX* de réaliser des expériences de complémentation à l'aide de plasmides recombinants produisant des protéines *PpaX* tronquées (courtes) en vue de tester l'activité de résistance à la salinité.

Enfin, l'ensemble des informations générées par ce travail pourrait servir dans l'avenir dans des applications diverses dans les domaines industriels, sanitaires et agricoles.

En perspectives, les outils de clonage réalisés dans le cadre de ce travail seront utilisés pour compléter cette étude. Dans un premier temps, une souche de *B. Velezensis* mutée au niveau gène *ppaX* sera construite, l'étude de son phénotype devra statuer sur la relation directe dans la résistance à la salinité. Les autres plasmides recombinants serviront à la surexpression des protéines recombinantes (*GST-PpaX* et *His6-PpaX*), qui une fois purifiées, aideront à produire des anticorps spécifiques pouvant être utilisés dans des expériences d'immunoprécipitation ou de co-purification, afin d'identifier des partenaires d'interaction protéiques de *Ppase*.

Bacillus velezensis est considérée comme un agent biocontrôle précieux et multifonctionnel, ouvrant plusieurs horizons d'applications dans le domaine médicale et végétal. Une recherche

approfondie sur le mécanisme d'action de la résistance à la salinité de *B.velezensis* par l'exploration de sa capacité à former le biofilm, distribuer les ions, produire des métabolites secondaires sans oublier l'établissement de son profil zymogram.(Wu et al., 2020) , seraient une avancée majeure dans le traitement de la salinité (des sols et des intestins).

REFERENCES

VI. REFERENCES

- Abbas, R., Rasul, S., Aslam, K., Baber, M., Shahid, M., Mubeen, F., & Naqqash, T. (2019). Halotolerant PGPR : A hope for cultivation of saline soils. *Journal of King Saud University - Science*, 31(4), 1195-1201. <https://doi.org/10.1016/j.jksus.2019.02.019>
- Arif, Y., Singh, P., Siddiqui, H., Bajguz, A., & Hayat, S. (2020). Salinity induced physiological and biochemical changes in plants : An omic approach towards salt stress tolerance. *Plant Physiology and Biochemistry: PPB*, 156, 64-77. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2020.08.042>
- Armougom, F., Moretti, S., Poirot, O., Audic, S., Dumas, P., Schaeli, B., Keduas, V., & Notredame, C. (2006). Espresso : Automatic incorporation of structural information in multiple sequence alignments using 3D-Coffee. *Nucleic Acids Research*, 34(Web Server issue), W604-608. <https://doi.org/10.1093/nar/gkl092>
- Baykov, A. A., Malinen, A. M., Luoto, H. H., & Lahti, R. (2013). Pyrophosphate-Fueled Na⁺ and H⁺ Transport in Prokaryotes. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 77(2), 267-276. <https://doi.org/10.1128/MMBR.00003-13>
- Beevers, D. G., Lip, G. Y. H., & Blann, A. D. (2004). Salt intake and Helicobacter pylori infection. *Journal of Hypertension*, 22(8), 1475-1477. <https://doi.org/10.1097/01.hjh.0000133736.77866.77>
- Belogurov, G. A., Malinen, A. M., Turkina, M. V., Jalonen, U., Rytönen, K., Baykov, A. A., & Lahti, R. (2005). Membrane-bound pyrophosphatase of *Thermotoga maritima* requires sodium for activity. *Biochemistry*, 44(6), 2088-2096. <https://doi.org/10.1021/bi048429g>
- Bui, T. T., Wright, S. A., Falk, A. B., Vanwalleghem, T., Van Hemelrijck, W., Hertog, M. L., Keulemans, J., & Davey, M. W. (2019). Botrytis cinerea differentially induces

postharvest antioxidant responses in 'Braeburn' and 'Golden Delicious' apple fruit.

Journal of the Science of Food and Agriculture, 99(13), 5662-5670.

<https://doi.org/10.1002/jsfa.9827>

Burkett-Cadena, M., Kokalis-Burelle, N., Lawrence, K. S., van Santen, E., & Kloepper, J. W.

(2008). Suppressiveness of root-knot nematodes mediated by rhizobacteria. *Biological*

Control, 47(1), 55-59. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2008.07.008>

Chen, X. H., Koumoutsis, A., Scholz, R., Eisenreich, A., Schneider, K., Heinemeyer, I.,

Morgenstern, B., Voss, B., Hess, W. R., Reva, O., Junge, H., Voigt, B., Jungblut, P.

R., Vater, J., Süßmuth, R., Liesegang, H., Strittmatter, A., Gottschalk, G., & Borriss,

R. (2007). Comparative analysis of the complete genome sequence of the plant

growth-promoting bacterium *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42. *Nature*

Biotechnology, 25(9), 1007-1014. <https://doi.org/10.1038/nbt1325>

Chowdhury, S. P., Uhl, J., Grosch, R., Alquéres, S., Pittroff, S., Dietel, K., Schmitt-Kopplin,

P., Borriss, R., & Hartmann, A. (2015). Cyclic Lipopeptides of *Bacillus*

amyloliquefaciens subsp. *Plantarum* Colonizing the Lettuce Rhizosphere Enhance

Plant Defense Responses Toward the Bottom Rot Pathogen *Rhizoctonia solani*.

Molecular Plant-Microbe Interactions: MPMI, 28(9), 984-995.

<https://doi.org/10.1094/MPMI-03-15-0066-R>

Compant, S., Duffy, B., Nowak, J., Clément, C., & Barka, E. A. (2005). Use of plant growth-

promoting bacteria for biocontrol of plant diseases : Principles, mechanisms of action,

and future prospects. *Applied and Environmental Microbiology*, 71(9), 4951-4959.

<https://doi.org/10.1128/AEM.71.9.4951-4959.2005>

Datasets. (s. d.). NCBI. Consulté 22 janvier 2021, à l'adresse

https://www.ncbi.nlm.nih.gov/datasets/tables/genes/?table_type=transcripts&key=e79

4caab9d6627321afae3a916f597ba

- Demarre, G., Guérout, A.-M., Matsumoto-Mashimo, C., Rowe-Magnus, D. A., Marlière, P., & Mazel, D. (2005). A new family of mobilizable suicide plasmids based on broad host range R388 plasmid (IncW) and RP4 plasmid (IncP α) conjugative machineries and their cognate *Escherichia coli* host strains. *Research in Microbiology*, 156(2), 245-255. <https://doi.org/10.1016/j.resmic.2004.09.007>
- Egondola. (s. d.). *AGAR BACTERIOLOGIQUE TYPE E*. Groupe Solabia. Consulté 30 juillet 2021, à l'adresse https://www.solabia.com/Produto_140,9/BIOKAR-Diagnostics/AGAR-BACTERIOLOGIQUE-TYPE-E-.html
- ExoSAP-ITTM PCR Product Cleanup Reagent*. (s. d.). Consulté 16 juillet 2021, à l'adresse <https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/78205.10.ML>
- Fan, B., Blom, J., Klenk, H.-P., & Borriss, R. (2017). *Bacillus amyloliquefaciens*, *Bacillus velezensis*, and *Bacillus siamensis* Form an “Operational Group *B. amyloliquefaciens*” within the *B. subtilis* Species Complex. *Frontiers in Microbiology*, 8. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.00022>
- Ferrara, L. A., de Simone, G., Pasanisi, F., Mancini, M., & Mancini, M. (1984). Left ventricular mass reduction during salt depletion in arterial hypertension. *Hypertension (Dallas, Tex.: 1979)*, 6(5), 755-759. <https://doi.org/10.1161/01.hyp.6.5.755>
- Filho, A. M. M., Pirozi, M. R., Borges, J. T. D. S., Pinheiro Sant'Ana, H. M., Chaves, J. B. P., & Coimbra, J. S. D. R. (2017). Quinoa : Nutritional, functional, and antinutritional aspects. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 57(8), 1618-1630. <https://doi.org/10.1080/10408398.2014.1001811>
- Fukushima, T., Allred, B. E., Sia, A. K., Nichiporuk, R., Andersen, U. N., & Raymond, K. N. (2013). Gram-positive siderophore-shuttle with iron-exchange from Fe-siderophore to apo-siderophore by *Bacillus cereus* YxeB. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 110(34), 13821-13826.

- Gasteiger, E., Gattiker, A., Hoogland, C., Ivanyi, I., Appel, R. D., & Bairoch, A. (2003). ExPASy : The proteomics server for in-depth protein knowledge and analysis. *Nucleic Acids Research*, *31*(13), 3784-3788. <https://doi.org/10.1093/nar/gkg563>
- Hartmann, A., Rothballer, M., & Schmid, M. (2008). Lorenz Hiltner, a pioneer in rhizosphere microbial ecology and soil bacteriology research. *Plant and Soil*, *312*(1), 7-14. <https://doi.org/10.1007/s11104-007-9514-z>
- He, F. J., & MacGregor, G. A. (2009). A comprehensive review on salt and health and current experience of worldwide salt reduction programmes. *Journal of Human Hypertension*, *23*(6), 363-384. <https://doi.org/10.1038/jhh.2008.144>
- Hill, C., Guarner, F., Reid, G., Gibson, G. R., Merenstein, D. J., Pot, B., Morelli, L., Canani, R. B., Flint, H. J., Salminen, S., Calder, P. C., & Sanders, M. E. (2014). Expert consensus document. The International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics consensus statement on the scope and appropriate use of the term probiotic. *Nature Reviews. Gastroenterology & Hepatology*, *11*(8), 506-514. <https://doi.org/10.1038/nrgastro.2014.66>
- Hinojosa, L., González, J., Barrios-Masias, F., Fuentes, F., & Murphy, K. (2018). Quinoa Abiotic Stress Responses : A Review. *Plants*, *7*(4), 106. <https://doi.org/10.3390/plants7040106>
- Hong, H. A., Duc, L. H., & Cutting, S. M. (2005). The use of bacterial spore formers as probiotics. *FEMS Microbiology Reviews*, *29*(4), 813-835. <https://doi.org/10.1016/j.femsre.2004.12.001>
- Ibarra-Villarreal, A. L., Gándara-Ledezma, A., Godoy-Flores, A. D., Herrera-Sepúlveda, A., Díaz-Rodríguez, A. M., Parra-Cota, F. I., & de los Santos-Villalobos, S. (2021). Salt-tolerant *Bacillus* species as a promising strategy to mitigate the salinity stress in wheat

- (*Triticum turgidum* subsp. *Durum*). *Journal of Arid Environments*, 186, 104399.
<https://doi.org/10.1016/j.jaridenv.2020.104399>
- Isayenkov, S. V., & Maathuis, F. J. M. (2019). Plant Salinity Stress : Many Unanswered Questions Remain. *Frontiers in Plant Science*, 10.
<https://doi.org/10.3389/fpls.2019.00080>
- Jensen, G. B., Larsen, P., Jacobsen, B. L., Madsen, B., Smidt, L., & Andrup, L. (2002). *Bacillus thuringiensis* in Fecal Samples from Greenhouse Workers after Exposure to *B. thuringiensis*-Based Pesticides. *Applied and Environmental Microbiology*, 68(10), 4900-4905. <https://doi.org/10.1128/AEM.68.10.4900-4905.2002>
- Kimura 木村 啓太郎, K., & Yokoyama 横山 智, S. (2019). Trends in the application of *Bacillus* in fermented foods. *Current Opinion in Biotechnology*, 56, 36-42.
<https://doi.org/10.1016/j.copbio.2018.09.001>
- La Déclaration universelle des droits de l'homme*. (2015, octobre 6).
<https://www.un.org/fr/universal-declaration-human-rights/>
- Lee, N.-K., Kim, W.-S., & Paik, H.-D. (2019). *Bacillus* strains as human probiotics : Characterization, safety, microbiome, and probiotic carrier. *Food Science and Biotechnology*, 28(5), 1297-1305. <https://doi.org/10.1007/s10068-019-00691-9>
- Lee, N.-K., Son, S.-H., Jeon, E. B., Jung, G. H., Lee, J.-Y., & Paik, H.-D. (2015). The prophylactic effect of probiotic *Bacillus polyfermenticus* KU3 against cancer cells. *Journal of Functional Foods, Complete*(14), 513-518.
<https://doi.org/10.1016/j.jff.2015.02.019>
- Liu, Z., Budiharjo, A., Wang, P., Shi, H., Fang, J., Borriss, R., Zhang, K., & Huang, X. (2013). The highly modified microcin peptide plantazolicin is associated with nematicidal activity of *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 97(23), 10081-10090. <https://doi.org/10.1007/s00253-013-5247-5>

- Luoto, H. H., Baykov, A. A., Lahti, R., & Malinen, A. M. (2013a). Membrane-integral pyrophosphatase subfamily capable of translocating both Na⁺ and H⁺. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *110*(4), 1255-1260. <https://doi.org/10.1073/pnas.1217816110>
- Luoto, H. H., Baykov, A. A., Lahti, R., & Malinen, A. M. (2013b). Membrane-integral pyrophosphatase subfamily capable of translocating both Na⁺ and H⁺. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *110*(4), 1255-1260. <https://doi.org/10.1073/pnas.1217816110>
- Macfarlane, G. T., Cummings, J. H., & Allison, C. (1986). Protein degradation by human intestinal bacteria. *Journal of General Microbiology*, *132*(6), 1647-1656. <https://doi.org/10.1099/00221287-132-6-1647>
- Mahdi, I., Fahsi, N., Hafidi, M., Allaoui, A., & Biskri, L. (2020). Plant Growth Enhancement using Rhizospheric Halotolerant Phosphate Solubilizing Bacterium *Bacillus licheniformis* QA1 and *Enterobacter asburiae* QF11 Isolated from *Chenopodium quinoa* Willd. *Microorganisms*, *8*(6), 948. <https://doi.org/10.3390/microorganisms8060948>
- Malinen, A. M., Belogurov, G. A., Baykov, A. A., & Lahti, R. (2007). Na⁺-pyrophosphatase : A novel primary sodium pump. *Biochemistry*, *46*(30), 8872-8878. <https://doi.org/10.1021/bi700564b>
- Markowiak, P., & Śliżewska, K. (2017). Effects of Probiotics, Prebiotics, and Synbiotics on Human Health. *Nutrients*, *9*(9). <https://doi.org/10.3390/nu9091021>
- Mirete, S., Mora-Ruiz, M. R., Lamprecht-Grandío, M., de Figueras, C. G., Rosselló-Móra, R., & González-Pastor, J. E. (2015). Salt resistance genes revealed by functional metagenomics from brines and moderate-salinity rhizosphere within a hypersaline

- environment. *Frontiers in Microbiology*, 6, 1121.
<https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.01121>
- Mm, W., J, A., Aa, L., Sr, T., Nr, C., & J, W. (2017). The science of salt : A regularly updated systematic review of salt and health outcomes (December 2015-March 2016). *Journal of Clinical Hypertension (Greenwich, Conn.)*, 19(3). <https://doi.org/10.1111/jch.12970>
- Moyle, J., Mitchell, R., & Mitchell, P. (1972). Proton-translocating pyrophosphatase of *Rhodospirillum rubrum*. *FEBS Letters*, 23(2), 233-236. [https://doi.org/10.1016/0014-5793\(72\)80349-1](https://doi.org/10.1016/0014-5793(72)80349-1)
- Nagata, C., Takatsuka, N., Shimizu, N., & Shimizu, H. (2004). Sodium intake and risk of death from stroke in Japanese men and women. *Stroke*, 35(7), 1543-1547.
<https://doi.org/10.1161/01.STR.0000130425.50441.b0>
- Notredame, C., Higgins, D. G., & Heringa, J. (2000). T-Coffee : A novel method for fast and accurate multiple sequence alignment. *Journal of Molecular Biology*, 302(1), 205-217.
<https://doi.org/10.1006/jmbi.2000.4042>
- Ongena, M., & Jacques, P. (2008). Bacillus lipopeptides : Versatile weapons for plant disease biocontrol. *Trends in Microbiology*, 16(3), 115-125.
<https://doi.org/10.1016/j.tim.2007.12.009>
- Ossowicki, A., Jafra, S., & Garbeva, P. (2017). The antimicrobial volatile power of the rhizospheric isolate *Pseudomonas donghuensis* P482. *PloS One*, 12(3), e0174362.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0174362>
- PCR Primer Stats*. (s. d.). Consulté 5 août 2021, à l'adresse
https://www.bioinformatics.org/sms2/pcr_primer_stats.html
- Pérez-García, A., Romero, D., & de Vicente, A. (2011). Plant protection and growth stimulation by microorganisms : Biotechnological applications of Bacilli in

- agriculture. *Current Opinion in Biotechnology*, 22(2), 187-193.
<https://doi.org/10.1016/j.copbio.2010.12.003>
- Perry, I. J., & Beevers, D. G. (1992). Salt intake and stroke : A possible direct effect. *Journal of Human Hypertension*, 6(1), 23-25.
- Pitzschke, A. (2016). Developmental Peculiarities and Seed-Borne Endophytes in Quinoa : Omnipresent, Robust Bacilli Contribute to Plant Fitness. *Frontiers in Microbiology*, 0.
<https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.00002>
- Probiotic_guidelines.pdf*. (s. d.). Consulté 11 août 2021, à l'adresse
https://www.who.int/foodsafety/fs_management/en/probiotic_guidelines.pdf
- Pyrophosphatase [Bacillus subtilis]—Protein—NCBI*. (s. d.). Consulté 31 août 2021, à l'adresse <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/KOS73456.1?report=fasta>
- Pyrophosphatase [Bacillus velezensis]—Protein—NCBI*. (s. d.). Consulté 31 août 2021, à l'adresse <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/KFI14974.1?report=fasta>
- Rabbee, M., Ali, Md., Choi, J., Hwang, B., Jeong, S., & Baek, K. (2019). Bacillus velezensis : A Valuable Member of Bioactive Molecules within Plant Microbiomes. *Molecules*, 24(6), 1046. <https://doi.org/10.3390/molecules24061046>
- Reimer, L. C., Vetcinova, A., Carbasse, J. S., Söhngen, C., Gleim, D., Ebeling, C., & Overmann, J. (2019). Bac Dive in 2019 : Bacterial phenotypic data for High-throughput biodiversity analysis. *Nucleic Acids Research*, 47(D1), D631-D636.
<https://doi.org/10.1093/nar/gky879>
- Rinninella, E., Raoul, P., Cintoni, M., Franceschi, F., Miggianno, G. A. D., Gasbarrini, A., & Mele, M. C. (2019). What is the Healthy Gut Microbiota Composition? A Changing Ecosystem across Age, Environment, Diet, and Diseases. *Microorganisms*, 7(1).
<https://doi.org/10.3390/microorganisms7010014>

- Rolfe, M. D., Rice, C. J., Lucchini, S., Pin, C., Thompson, A., Cameron, A. D. S., Alston, M., Stringer, M. F., Betts, R. P., Baranyi, J., Peck, M. W., & Hinton, J. C. D. (2012). Lag Phase Is a Distinct Growth Phase That Prepares Bacteria for Exponential Growth and Involves Transient Metal Accumulation. *Journal of Bacteriology*, *194*(3), 686.
<https://doi.org/10.1128/JB.06112-11>
- Ruiz-García, C., Béjar, V., Martínez-Checa, F., Llamas, I., & Quesada, E. (2005). *Bacillus velezensis* sp. Nov., a surfactant-producing bacterium isolated from the river Vélez in Málaga, southern Spain. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, *55*(Pt 1), 191-195. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.63310-0>
- Sanchez-Villeda, H., Schroeder, S., Flint-Garcia, S., Guill, K. E., Yamasaki, M., & McMullen, M. D. (2008). DNAAAlignEditor : DNA alignment editor tool. *BMC Bioinformatics*, *9*, 154. <https://doi.org/10.1186/1471-2105-9-154>
- Sasse, J., Martinoia, E., & Northen, T. (2018). Feed Your Friends : Do Plant Exudates Shape the Root Microbiome? *Trends in Plant Science*, *23*(1), 25-41.
<https://doi.org/10.1016/j.tplants.2017.09.003>
- Schäfer, F., Seip, N., Maertens, B., Block, H., & Kubicek, J. (2015). Purification of GST-Tagged Proteins. *Methods in Enzymology*, *559*, 127-139.
<https://doi.org/10.1016/bs.mie.2014.11.005>
- Sievers, F., & Higgins, D. G. (2014). Clustal omega. *Current Protocols in Bioinformatics*, *48*, 3.13.1-16. <https://doi.org/10.1002/0471250953.bi0313s48>
- Singh, M. I., & Jain, V. (2013). Tagging the expressed protein with 6 histidines : Rapid cloning of an amplicon with three options. *PloS One*, *8*(5), e63922.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0063922>

- Sleator, R. D., & Hill, C. (2002). Bacterial osmoadaptation : The role of osmolytes in bacterial stress and virulence. *FEMS Microbiology Reviews*, 26(1), 49-71.
<https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2002.tb00598.x>
- SnapGene / Software for everyday molecular biology*. (s. d.). SnapGene. Consulté 3 août 2021, à l'adresse <https://www.snapgene.com/>
- Tagu, D., & Moussard, C. (2003). *Principes des techniques de biologie moléculaire*.
- Tamang, J. P., Watanabe, K., & Holzapfel, W. H. (2016). Review : Diversity of Microorganisms in Global Fermented Foods and Beverages. *Frontiers in Microbiology*, 0. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.00377>
- Tobian, L., & Hanlon, S. (1990). High sodium chloride diets injure arteries and raise mortality without changing blood pressure. *Hypertension*, 15(6_pt_2), 900-903.
<https://doi.org/10.1161/01.HYP.15.6.900>
- Tsai, J.-Y., Kellosalo, J., Sun, Y.-J., & Goldman, A. (2014). Proton/sodium pumping pyrophosphatases : The last of the primary ion pumps. *Current Opinion in Structural Biology*, 27, 38-47. <https://doi.org/10.1016/j.sbi.2014.03.007>
- Tsuji, S., Tsujii, M., Murata, H., Nishida, T., Komori, M., Yasumaru, M., Ishii, S., Sasayama, Y., Kawano, S., & Hayashi, N. (2006). Helicobacter pylori eradication to prevent gastric cancer : Underlying molecular and cellular mechanisms. *World Journal of Gastroenterology : WJG*, 12(11), 1671-1680.
<https://doi.org/10.3748/wjg.v12.i11.1671>
- Uncultured bacterium clone pSR8 putative sodium transporter gene, partial cds (743484952)*. (2015). [Data set]. NCBI Nucleotide Database.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/KM603482.1>

- Wu, T., Wu, X.-Q., Xu, X., Kong, W., & Wu, F. (2020). Salt Tolerance Mechanism and Species Identification of the Plant Rhizosphere Bacterium JYZ-SD2. *Current Microbiology*, 77(3), 388-395. <https://doi.org/10.1007/s00284-019-01835-0>
- Xie, J. X., Sasaki, S., Joossens, J. V., & Kesteloot, H. (1992). The relationship between urinary cations obtained from the INTERSALT study and cerebrovascular mortality. *Journal of Human Hypertension*, 6(1), 17-21.
- Y, M., Fj, H., & Ga, M. (2015). High salt intake : Independent risk factor for obesity? *Hypertension (Dallas, Tex. : 1979)*, 66(4).
<https://doi.org/10.1161/HYPERTENSIONAHA.115.05948>
- Yang, H. J., Kwon, D. Y., Kim, H. J., Kim, M. J., Jung, D. Y., Kang, H. J., Kim, D. S., Kang, S., Moon, N. R., Shin, B. K., & Park, S. (2015). Fermenting soybeans with *Bacillus licheniformis* potentiates their capacity to improve cognitive function and glucose homeostasis in diabetic rats with experimental Alzheimer's type dementia. *European Journal of Nutrition*, 54(1), 77-88. <https://doi.org/10.1007/s00394-014-0687-y>
- Yang, L., Liao, R.-Z., Yu, J.-G., & Liu, R.-Z. (2009). DFT study on the mechanism of *Escherichia coli* inorganic pyrophosphatase. *The Journal of Physical Chemistry. B*, 113(18), 6505-6510. <https://doi.org/10.1021/jp810003w>
- Yoon, H.-S., Kim, S.-Y., & Kim, I.-S. (2013). Stress response of plant H⁺-PPase-expressing transgenic *Escherichia coli* and *Saccharomyces cerevisiae* : A potentially useful mechanism for the development of stress-tolerant organisms. *Journal of Applied Genetics*, 54(1), 129-133. <https://doi.org/10.1007/s13353-012-0117-x>

ANNEXES


```

T-COFFEE, Version_11.00 (Version_11.00)
Cedric Notredame
SCORE=72
*
BAD AVG GOOD
*
unculturedbacte : 52
Bacillussubtili : 80
Bacillusvelezen : 79
cons : 7

unculturedbacte SLAYIVFVQLLGVDEAF-----
Bacillussubtili MSDKQVTTILFDLDGTLINTNELIIASFHLTLEHYYP SKYKREDVLAFIGPSLFETFSSMDPD
Bacillusvelezen MTDKRVTAILFDLDGTLIDTNELIIASYLHTLDHYCPGQFKREDVLPFIGPPLYETFSGINAE

cons * . * : . : * : :

unculturedbacte -----Q--VVATFALGASSIALFARIGGGIYTKAADV
Bacillussubtili KCEDMIAMYRAYNHDMHDSLVTEYETVYETLDALKKAGFTLGIVTTKLRDVTNMGLKLTGIGE
Bacillusvelezen KCDEMI SMYRAF NHEKHDELVT EYETVYETLDELKKAGYQLGIVTTKLRDVTNMGLKLTGIGA

cons : * : ** : * : . * : . .

unculturedbacte GADLVGK-VEAGIPEDDPRNPA-----TIADNVGDNVGDV-AGMGADLF-ESYAGSI
Bacillussubtili FFETVVTLD DVTNAKPDPE-PVLLALKQLGSKPEEAIMVGDNYHDVLAGKNAGTKTAGVAWTI
Bacillusvelezen FFDTVVTLD DVKHHPKPDPE-PVRLALSRLGCDPSEALMVGDNYHDMAGKNAGTKTAGVAWTI

cons : * . : . . : ** . * * **** ** ** . * . * : *

unculturedbacte IAPMVLAAALFGGVQSGGALVDQFSSLQQATFLFPLFVGAVGMVAS-
Bacillussubtili KGPEMLAKH-----EPDFMLEKMSDLLQIV-----GVK
Bacillusvelezen KGAQTL SAY-----EPDYMLEKMSDLLHIT-----GVK

cons .. * : . . : : : : * . * : .

```

Figure 47: Alignement des séquences protéiques *PPase* codée par l'*ORF pSR8* et celles des souches de *B.subtilis*, *B.velezensis* par Espresso, TCoffee

VII.2. Composition des milieux de culture

VII.2.1. TSB medium

Le bouillon Trypto-caséine soja (TSB) est un milieu nutritif universel , commercialisé sous forme de poudre et constitué de : Tryptone 17,0 g/L, Peptone papainique de soja 3,0 g/L , Glucose 2,5 g/L , Phosphate dipotassique 2,5 g/L , Chlorure de sodium 5,0 g/L, pH = 7,3 ± 0,2. (Egondola, s. d.)

VII.2.2. TSA medium

Le milieu TSA : Trypto-caséine soja agar est conçu en ajoutant 9mg du TSB et 4,5mg agar bactériologique de type E (Egondola, s. d.) dans 300ml d'eau ultrapure stérile.



Figure 48: Photo du stock préparé de boîtes de pétri -TSA Medium-

VII.3. Préparation des milieux TSA et TSB à différentes concentrations de NaCl

Le test de salinité est réalisé sur les milieux TSA et TSB, à différentes concentrations de NaCl.

Tableau 7: Préparation des milieux de culture à différentes concentrations de NaCl pour le test de salinité

| NaCl (%) | NaCl (grammes) | milieux (TSA/ TSB) (millilitres) |
|------------------|----------------|----------------------------------|
| 3% | 3 g | 100 ml |
| 5% | 5 g | 100 ml |
| 8% | 8 g | 100 ml |
| 12% | 12 g | 100 ml |
| Autoclave | | |

VII.4. Résultats du test de salinité en milieu liquide

Les tableaux suivants représentent les moyennes et les écart-types des résultats du test de salinité, des souches *E.coli DH5α*, *QA1*, *QA2*, *Z16*, *DN59* et *DN74*, à différentes concentrations de NaCl (0,3,5,8,12, 15) %, en milieu liquide :

Tableau 8: Moyennes des triplicatas de DO600 mesurées pour DH5 α , en milieu liquide, à différentes concentrations (0,3,5,8,12, 15)% de NaCl, pendant 24 heures

| DH5 α | 0 2H | 4H | 6H | 8H | 10H | 12H | 14H | 16H | 18H | 20H | 22H | 24H | |
|--------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|--------|------------|------------|------------|------------|
| 0% NaCl | 0,08866667 | 0,453 | 0,89716667 | 1,17483333 | 1,34683333 | 1,45833333 | 1,59483333 | 1,56016667 | 1,557 | 1,58683333 | 1,55 | 1,5585 | 1,513 |
| 3% NaCl | 0,0635 | 0,14016667 | 0,471 | 0,61333333 | 0,774 | 0,69433333 | 0,7635 | 1,209 | 1,0365 | 1,01616667 | 0,99483333 | 1,005 | 0,98666667 |
| 5% NaCl | 0,05066667 | 0,075 | 0,13033333 | 0,20616667 | 0,27683333 | 0,30966667 | 0,38783333 | 0,433 | 0,48 | 0,48683333 | 0,6015 | 0,58416667 | 0,52233333 |
| 8% NaCl | 0,0715 | 0,0855 | 0,102 | 0,11466667 | 0,12366667 | 0,13 | 0,1335 | 0,134 | 0,14 | 0,143 | 0,13933333 | 0,13966667 | 0,14316667 |
| 12% NaCl | 0,05233333 | 0,05833333 | 0,06333333 | 0,06933333 | 0,07333333 | 0,07666667 | 0,07366667 | 0,074 | 0,0895 | 0,09316667 | 0,10466667 | 0,107 | 0,09966667 |

Tableau 9: Moyennes des triplicatas de DO600 mesurées pour QA1, en milieu liquide, à différentes concentrations (0,3,5,8,12, 15)% de NaCl, pendant 24 heures

| QA1 | 0 2H | 4H | 6H | 8H | 10H | 12H | 14H | 16H | 18H | 20H | 22H | 24H | |
|----------|-------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|--------|------------|------------|------------|------------|
| 0% NaCl | 0,19416667 | 0,1 | 0,15016667 | 0,18183333 | 0,20083333 | 0,19833333 | 0,19733333 | 0,17916667 | 0,1705 | 0,17783333 | 0,139 | 0,1255 | 0,09 |
| 3% NaCl | 0,0335 | 0,05516667 | 0,11 | 0,19583333 | 0,2355 | 0,26733333 | 0,2965 | 0,313 | 0,3105 | 0,30916667 | 0,31683333 | 0,301 | 0,28866667 |
| 5% NaCl | -0,00133333 | 0,024 | 0,04133333 | 0,07966667 | 0,09583333 | 0,10716667 | 0,12433333 | 0,129 | 0,1375 | 0,13683333 | 0,14 | 0,14116667 | 0,12533333 |
| 8% NaCl | 0,0245 | 0,0555 | 0,066 | 0,13716667 | 0,16866667 | 0,1775 | 0,1895 | 0,1865 | 0,187 | 0,181 | 0,17083333 | 0,16166667 | 0,15166667 |
| 12% NaCl | 0,01333333 | 0,02883333 | 0,03233333 | 0,04383333 | 0,06683333 | 0,06866667 | 0,06866667 | 0,0595 | 0,0485 | 0,03916667 | 0,02816667 | 0,0225 | 0,01516667 |

Tableau 10: Moyennes des triplicatas de DO600 mesurées pour QA2, en milieu liquide, à différentes concentrations (0,3,5,8,12, 15)% de NaCl, pendant 24 heures

| QA2 | 0 2H | 4H | 6H | 8H | 10H | 12H | 14H | 16H | 18H | 20H | 22H | 24H | |
|----------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|--------|------------|------------|------------|------------|
| 0% NaCl | 0,43416667 | 0,735 | 1,43566667 | 1,34733333 | 0,95483333 | 0,91383333 | 0,84633333 | 0,80666667 | 0,777 | 0,74783333 | 0,719 | 0,6925 | 0,685 |
| 3% NaCl | 0,152 | 0,38766667 | 1,134 | 1,22383333 | 1,4495 | 1,53433333 | 1,5325 | 1,5165 | 1,454 | 1,37466667 | 1,28383333 | 1,2075 | 1,13516667 |
| 5% NaCl | 0,14416667 | 0,2675 | 0,65283333 | 0,92566667 | 1,10383333 | 1,02416667 | 1,06133333 | 1,05 | 1,189 | 1,09933333 | 1,145 | 0,93366667 | 1,07383333 |
| 8% NaCl | 0,229 | 0,4035 | 0,3175 | 0,49016667 | 0,58816667 | 0,725 | 1,0005 | 1,098 | 1,0305 | 0,989 | 0,98783333 | 1,05366667 | 1,10966667 |
| 12% NaCl | 0,00733333 | 0,17833333 | 0,14783333 | 0,12733333 | 0,12083333 | 0,13066667 | 0,11516667 | 0,1375 | 0,178 | 0,37366667 | 0,47966667 | 0,6735 | 0,67116667 |

Tableau 11: Moyennes des triplicatas de DO600 mesurées pour Z16, en milieu liquide, à différentes concentrations (0,3,5,8,12, 15)% de NaCl, pendant 24 heures

| Z16 | 0 2H | 4H | 6H | 8H | 10H | 12H | 14H | 16H | 18H | 20H | 22H | 24H | |
|----------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|--------|------------|------------|------------|------------|
| 0% NaCl | 0,27716667 | 0,6495 | 1,24266667 | 1,26033333 | 1,23983333 | 1,17533333 | 1,04233333 | 0,90966667 | 0,8725 | 0,86283333 | 0,8545 | 0,8205 | 0,792 |
| 3% NaCl | 0,163 | 0,45066667 | 0,848 | 1,09483333 | 1,137 | 1,23933333 | 1,2455 | 1,2295 | 1,1745 | 1,13866667 | 1,09083333 | 1,037 | 0,98816667 |
| 5% NaCl | 0,04216667 | 0,1035 | 0,64983333 | 1,15666667 | 1,48933333 | 1,31566667 | 1,63483333 | 1,752 | 1,7505 | 1,98033333 | 1,9395 | 2,20566667 | 1,87283333 |
| 8% NaCl | 0,1815 | 0,2715 | 0,331 | 0,17516667 | 0,60166667 | 0,669 | 1,1425 | 1,3495 | 1,587 | 1,6575 | 1,69783333 | 1,66266667 | 1,64016667 |
| 12% NaCl | 0,08083333 | 0,06783333 | 0,06733333 | 0,04433333 | 0,05683333 | 0,07166667 | 0,07616667 | 0,0855 | 0,0965 | 0,18066667 | 0,24516667 | 0,293 | 0,48116667 |

Tableau 12: Moyennes des triplicatas de DO600 mesurées pour DN59, en milieu liquide, à différentes concentrations (0,3,5,8,12, 15)% de NaCl, pendant 24 heures

| DN59 | 0 2H | 4H | 6H | 8H | 10H | 12H | 14H | 16H | 18H | 20H | 22H | 24H | |
|----------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|--------|------------|------------|------------|------------|
| 0% NaCl | 0,42816667 | 0,551 | 1,14916667 | 1,20433333 | 1,00183333 | 0,92633333 | 0,90183333 | 0,84016667 | 0,7895 | 0,76333333 | 0,7405 | 0,721 | 0,7025 |
| 3% NaCl | 0,2435 | 0,50416667 | 1,0815 | 1,39933333 | 1,331 | 1,39633333 | 1,273 | 1,3175 | 1,2595 | 1,21416667 | 1,15233333 | 1,087 | 1,03416667 |
| 5% NaCl | 0,05966667 | 0,3355 | 0,71383333 | 1,15566667 | 1,43383333 | 1,64116667 | 1,40483333 | 1,4245 | 1,5195 | 1,41583333 | 1,3795 | 1,29966667 | 1,21533333 |
| 8% NaCl | 0,036 | 0,1165 | 0,1 | 0,15066667 | 0,81366667 | 1,134 | 0,952 | 1,226 | 1,108 | 1,1915 | 1,22383333 | 0,99416667 | 1,20066667 |
| 12% NaCl | 0,01383333 | 0,10383333 | 0,10533333 | 0,10283333 | 0,11183333 | 0,14466667 | 0,24816667 | 0,4805 | 0,571 | 0,62016667 | 0,82366667 | 0,843 | 0,81116667 |

Tableau 13: Moyennes des triplicatas de DO600 mesurées pour DN74, en milieu liquide, à différentes concentrations (0,3,5,8,12, 15)% de NaCl, pendant 24 heures

| DN74 | 0 2H | 4H | 6H | 8H | 10H | 12H | 14H | 16H | 18H | 20H | 22H | 24H | |
|----------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|--------|------------|------------|------------|------------|
| 0% NaCl | 0,45616667 | 0,781 | 1,55166667 | 1,24483333 | 1,13183333 | 1,05783333 | 0,93683333 | 0,88066667 | 0,83 | 0,78983333 | 0,761 | 0,7365 | 0,719 |
| 3% NaCl | 0,6455 | 0,60566667 | 1,181 | 1,23183333 | 1,1065 | 1,13633333 | 0,961 | 0,9015 | 0,868 | 0,86016667 | 0,84283333 | 0,8205 | 0,79766667 |
| 5% NaCl | 0,14316667 | 0,1015 | 0,77533333 | 1,27266667 | 1,64483333 | 1,72416667 | 1,39683333 | 1,4515 | 1,4815 | 1,31333333 | 1,409 | 1,37916667 | 1,34433333 |
| 8% NaCl | 0,0095 | 0,0955 | 0,073 | 0,26566667 | 0,62216667 | 0,67 | 0,949 | 0,9145 | 1,0005 | 1,0805 | 1,36333333 | 1,04316667 | 1,29966667 |
| 12% NaCl | 0,10783333 | 0,10983333 | 0,29783333 | 0,29133333 | 0,28483333 | 0,30266667 | 0,30216667 | 0,472 | 0,625 | 0,82116667 | 0,91566667 | 0,912 | 0,88616667 |

Tableau 14: Ecart-types des triplicatas de DO600 mesurées pour DH5α , en milieu liquide, à différentes concentrations (0,3,5,8,12, 15)% de NaCl, pendant 24 heures

| DH5α | 0 2H | 4H | 6H | 8H | 10H | 12H | 14H | 16H | 18H | 20H | 22H | 24H | |
|----------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|
| 0% NaCl | 0,02262742 | 0,04666905 | 0,00636396 | 0,01484924 | 0,01626346 | 0,03676955 | 0,17606959 | 0,07707464 | 0,06363961 | 0,15909903 | 0,11313708 | 0,08838835 | 0,06929646 |
| 3% NaCl | 0,04030509 | 0,07990307 | 0,23193102 | 0,0622254 | 0,04525483 | 0,05515433 | 0,11384419 | 0,30547013 | 0,13222897 | 0,10535891 | 0,10818734 | 0,04384062 | 0,08485281 |
| 5% NaCl | 0,01555635 | 0,00141421 | 0,01131371 | 0,00636396 | 0,00919239 | 0,02969848 | 0,03889087 | 0,00989949 | 0,03394113 | 0,01202082 | 0,14354268 | 0,1039447 | 0,00565685 |
| 8% NaCl | 0,00353553 | 0,00777817 | 0,00848528 | 0,01272792 | 0,01838478 | 0,01979899 | 0,0205061 | 0,02404163 | 0,0311127 | 0,03394113 | 0,02262742 | 0,02687006 | 0,02757716 |
| 12% NaCl | 0,02828427 | 0,02828427 | 0,02969848 | 0,02262742 | 0,02545584 | 0,01979899 | 0,02262742 | 0,02404163 | 0,00636396 | 0,01767767 | 0,02262742 | 0,02545584 | 0,03394113 |

Tableau 15: Ecart-types des triplicatas de DO600 mesurées pour QA1, en milieu liquide, à différentes concentrations (0,3,5,8,12, 15)% de NaCl, pendant 24 heures

| QA1 | 0 2H | 4H | 6H | 8H | 10H | 12H | 14H | 16H | 18H | 20H | 22H | 24H | |
|----------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|
| 0% NaCl | 0,19304015 | 0,0311127 | 0,04879037 | 0,04737615 | 0,05586144 | 0,05374012 | 0,0523259 | 0,03040559 | 0,03606245 | 0,01626346 | 0,03394113 | 0,0205061 | 0,00989949 |
| 3% NaCl | 0,01484924 | 0,01343503 | 0,02262742 | 0,01202082 | 0,01626346 | 0,01979899 | 0,03323402 | 0,04525483 | 0,07141778 | 0,07707464 | 0,08697413 | 0,10323759 | 0,11030866 |
| 5% NaCl | 0,01131371 | 0,01555635 | 0,01272792 | 0,09050967 | 0,11950105 | 0,13647161 | 0,15132085 | 0,16263456 | 0,17324116 | 0,16899852 | 0,1767767 | 0,17889802 | 0,16263456 |
| 8% NaCl | 0,00636396 | 0,00919239 | 0,00848528 | 0,00919239 | 0,01414214 | 0,01909188 | 0,0205061 | 0,01626346 | 0,01555635 | 0,00848528 | 0,00212132 | 0,00282843 | 0,00707107 |
| 12% NaCl | 0,00141421 | 0,00353553 | 0,00282843 | 0,01767767 | 0,02899138 | 0,01979899 | 0,0212132 | 0,02192031 | 0,01909188 | 0,01343503 | 0,00777817 | 0,00070711 | 0,00212132 |

Tableau 16: Ecart-types des triplicatas de DO600 mesurées pour QA2, en milieu liquide, à différentes concentrations (0,3,5,8,12, 15)% de NaCl, pendant 24 heures

| QA2 | 0 2H | 4H | 6H | 8H | 10H | 12H | 14H | 16H | 18H | 20H | 22H | 24H | |
|----------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|
| 0% NaCl | 0,02757716 | 0,09475231 | 0,14424978 | 0,00424264 | 0,26940768 | 0,29769195 | 0,34223968 | 0,3436539 | 0,34931075 | 0,34153258 | 0,33658283 | 0,33304729 | 0,32668333 |
| 3% NaCl | 0,1979899 | 0,25597265 | 0,20647518 | 0,1039447 | 0,0629325 | 0,05798276 | 0,11808683 | 0,20435386 | 0,20506097 | 0,21637468 | 0,21001071 | 0,15485639 | 0,13081475 |
| 5% NaCl | 0,16617009 | 0,24395184 | 0,09970206 | 0,24324473 | 0,49426764 | 0,34011836 | 0,34931075 | 0,34931075 | 0,56851385 | 0,46386205 | 0,57275649 | 0,32102648 | 0,54517933 |
| 8% NaCl | 0,29557063 | 0,24678027 | 0,12232947 | 0,23122392 | 0,21425335 | 0,09475231 | 0,23263813 | 0,08768124 | 0,26940768 | 0,36062446 | 0,09828784 | 0,01979899 | 0,26445794 |
| 12% NaCl | 0,04242641 | 0,03394113 | 0,03464823 | 0,07919596 | 0,08414571 | 0,05515433 | 0,08131728 | 0,08697413 | 0,10323759 | 0,02687006 | 0,00848528 | 0,04313351 | 0,02616295 |

Tableau 17: Ecart-types des triplicatas de DO600 mesurées pour Z16, en milieu liquide, à différentes concentrations (0,3,5,8,12, 15)% de NaCl, pendant 24 heures

| Z16 | 0 2H | 4H | 6H | 8H | 10H | 12H | 14H | 16H | 18H | 20H | 22H | 24H | |
|----------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|
| 0% NaCl | 0,28920667 | 0,53952247 | 0,38325188 | 0,40305087 | 0,35708892 | 0,3026417 | 0,29274221 | 0,32244069 | 0,29344931 | 0,26657926 | 0,23263813 | 0,21425335 | 0,19233304 |
| 3% NaCl | 0,15980613 | 0,20647518 | 0,20930361 | 0,10111627 | 0,17253405 | 0,06505382 | 0,02616295 | 0,07000357 | 0,07424621 | 0,07636753 | 0,06434672 | 0,06081118 | 0,0629325 |
| 5% NaCl | 0,04596194 | 0,00636396 | 0,04737615 | 0,06505382 | 0,13435029 | 0,16546299 | 0,24536605 | 0,04949747 | 0,03040559 | 0,07212489 | 0,13222897 | 0,03959798 | 0,33304729 |
| 8% NaCl | 0,18031223 | 0,29062089 | 0,38749452 | 0,16899852 | 0,38325188 | 0,1979899 | 0,11242998 | 0,11384419 | 0,17111984 | 0,19586858 | 0,20011122 | 0,06081118 | 0,06010408 |
| 12% NaCl | 0,10960155 | 0,05586144 | 0,03676955 | 0,01697056 | 0,03040559 | 0,04242641 | 0,0629325 | 0,072832 | 0,08414571 | 0,20223254 | 0,26375083 | 0,31112698 | 0,49709607 |

Tableau 18: Ecart-types des triplicatas de DO600 mesurées pour DN59, en milieu liquide, à différentes concentrations (0,3,5,8,12, 15)% de NaCl, pendant 24 heures

| DN59 | 0 2H | 4H | 6H | 8H | 10H | 12H | 14H | 16H | 18H | 20H | 22H | 24H | |
|----------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|
| 0% NaCl | 0,25667976 | 0,19940411 | 0,10960155 | 0,03252691 | 0,09263099 | 0,1767767 | 0,20718229 | 0,22415285 | 0,22132442 | 0,20223254 | 0,19728279 | 0,18950462 | 0,17324116 |
| 3% NaCl | 0,27365032 | 0,15061374 | 0,04030509 | 0,05656854 | 0,13435029 | 0,21213203 | 0,22061732 | 0,10253048 | 0,0629325 | 0,01484924 | 0,03252691 | 0,05798276 | 0,07707464 |
| 5% NaCl | 0 | 0,06858936 | 0,03323402 | 0,04525483 | 0,10535891 | 0,13364318 | 0,05586144 | 0,06717514 | 0,08273149 | 0,10960155 | 0,08555992 | 0,02687006 | 0,00989949 |
| 8% NaCl | 0,01979899 | 0,00777817 | 0,05374012 | 0,01414214 | 0,06929646 | 0,1880904 | 0,19233304 | 0,06929646 | 0,22627417 | 0,15768481 | 0,10535891 | 0,3132483 | 0,41012193 |
| 12% NaCl | 0,03606245 | 0,03040559 | 0,00707107 | 0,01343503 | 0,03040559 | 0,04101219 | 0,07000357 | 0,10677312 | 0,12303658 | 0,09545942 | 0,09192388 | 0,00424264 | 0,15768481 |

Tableau 19: Ecart-types des triplicatas de DO600 mesurées pour DN74, en milieu liquide, à différentes concentrations (0,3,5,8,12, 15)% de NaCl, pendant 24 heures

| DN74 | 0 2H | 4H | 6H | 8H | 10H | 12H | 14H | 16H | 18H | 20H | 22H | 24H | |
|----------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|
| 0% NaCl | 0,42355696 | 0,30122749 | 0,25880108 | 0,23829499 | 0,31041988 | 0,29486353 | 0,24536605 | 0,2192031 | 0,20506097 | 0,21708178 | 0,22061732 | 0,21566757 | 0,21213203 |
| 3% NaCl | 0,51830927 | 0,37335238 | 0,16546299 | 0,10253048 | 0,18314066 | 0,12445079 | 0,37052395 | 0,35567471 | 0,33799704 | 0,32456201 | 0,33587572 | 0,33446151 | 0,32385491 |
| 5% NaCl | 0,1350574 | 0,02474874 | 0,03252691 | 0,35921024 | 0,32739044 | 0,08414571 | 0,04454773 | 0,01909188 | 0,10818734 | 0,05091169 | 0,16263456 | 0,15768481 | 0,00848528 |
| 8% NaCl | 0,00353553 | 0,01484924 | 0,07919596 | 0,03535534 | 0,07990307 | 0,16546299 | 0,34931075 | 0,20435386 | 0,14919953 | 0,12798633 | 0,31112698 | 0,16192745 | 0,11030866 |
| 12% NaCl | 0,14212846 | 0,04030509 | 0,08555992 | 0,07353911 | 0,10253048 | 0,12020815 | 0,06151829 | 0,14849242 | 0,00989949 | 0,05444722 | 0,16546299 | 0,19233304 | 0,21001071 |

VII.5. Protocole de l'extraction du génome bactérien

1. Centrifuger un volume de 1,5 ml de la culture de nuit, à 17000 g, durant 1 minute et jeter le surnageant.
2. Ajouter 180 µl du buffer Lysozyme Digestion + lysozyme 20 mg/mL.
3. Agiter à l'aide du vortex et incubé 30 minutes, à 37°C.
4. Ajouter 20 µL de la Proteinase K et agiter brièvement.
5. Ajouter 200 µL du PureLink® Genomic Lysis/Binding Buffer et agiter brièvement.
6. Incuber 30 minutes, à 55°C.
7. Ajouter 200 µL de l'éthanol 100% et homogénéiser à l'aide du vortex .
8. Transvaser le lysat (~640 µL) dans une PureLink® Spin Column.
9. Centrifuger la colonne, 1 minute, à 10000g.
10. Placer la spin column dans un nouveau tube collecteur.
11. Ajouter 500 µL du Wash Buffer 1 préparé avec l'éthanol.
12. Centrifuger la colonne à température ambiante, à 10000 g, pour 1 minute.
13. Placer la spin column dans un nouveau tube collecteur.
14. Ajouter 500 µL du Wash Buffer 2, préparé avec l'éthanol.
15. Centrifuger la colonne, pendant 3 minutes, avec une vitesse maximale.
16. Placer la spin column dans un Eppendorf stérile.
17. Ajouter 50 µL du PureLink® Genomic Elution Buffer.
18. Incuber la colonne à température ambiante, pendant 1 minute.
19. Centrifuger la colonne, pendant 3 minutes, avec une vitesse maximale. Le tube Eppendorf contient l'ADN génomique extrait.

VII.1. Produits de PCR du gène *ppaX*

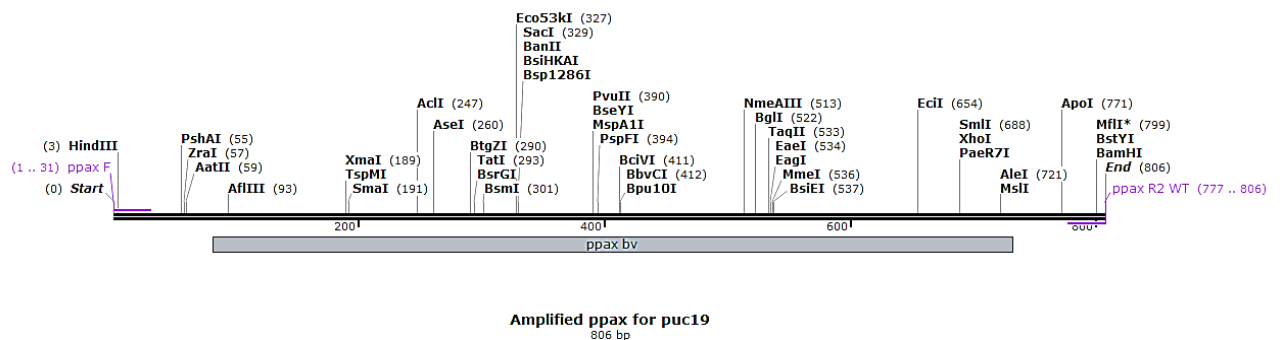


Figure 49: Carte de restriction du produit PCR du gène entier *ppaX* amplifié par les amorces *ppaxF* et *ppaxRWT*

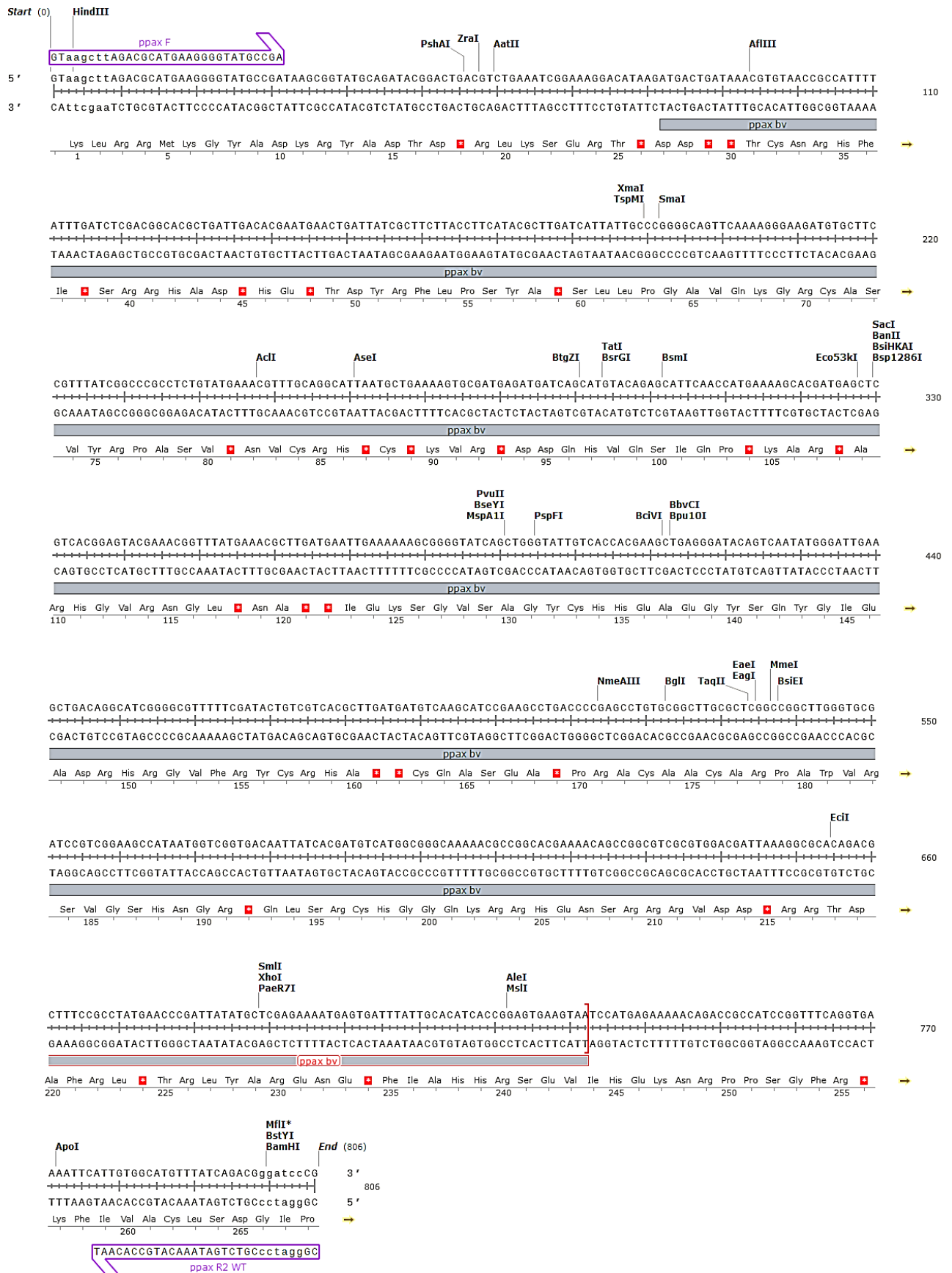


Figure 50: Séquence nucléotidique du produit PCR du gène entier *ppaX* amplifié par les amorces *ppaxF* et *ppaxR2 WT*

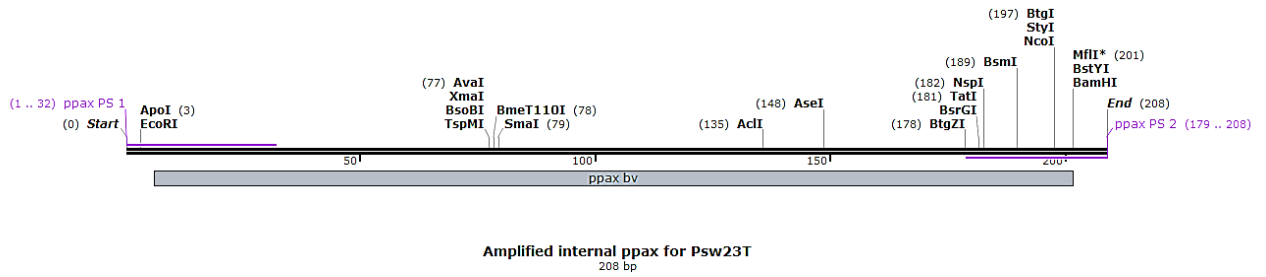


Figure 51: Carte de restriction du produit de PCR du fragment interne du gène *ppaX* amplifié par les amorces *ppaxFI* et *ppaxRI*

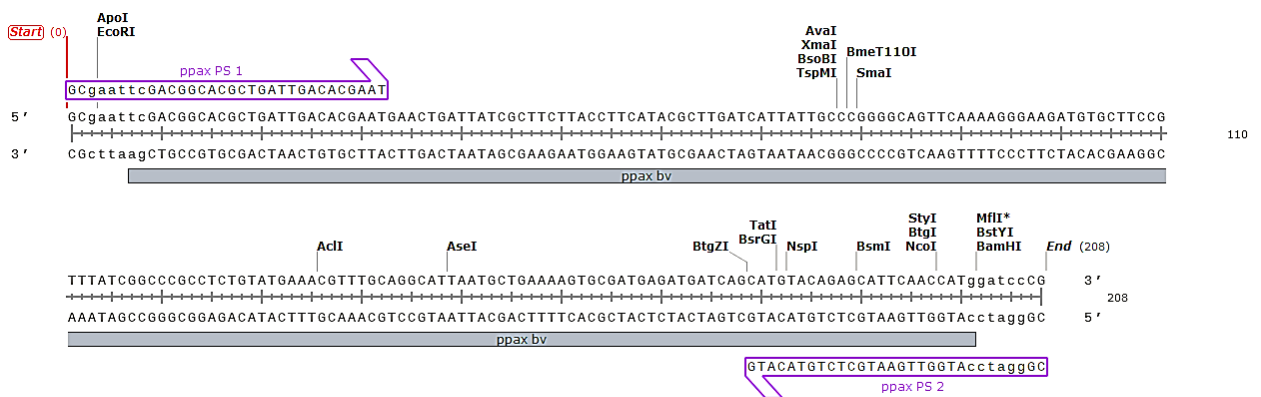


Figure 52: Séquence nucléotidique du produit PCR du gène interne *ppaX* amplifié par les amorces *ppaxFI* et *ppaxRI*, d'une taille totale de 208-pb

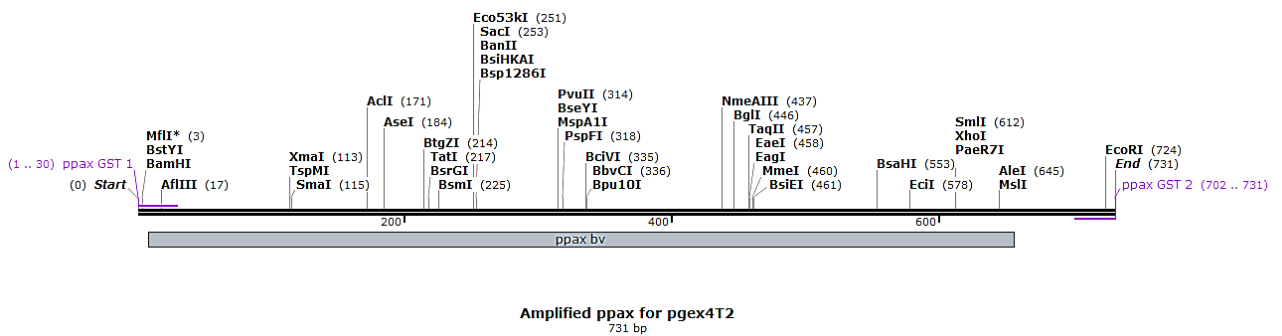
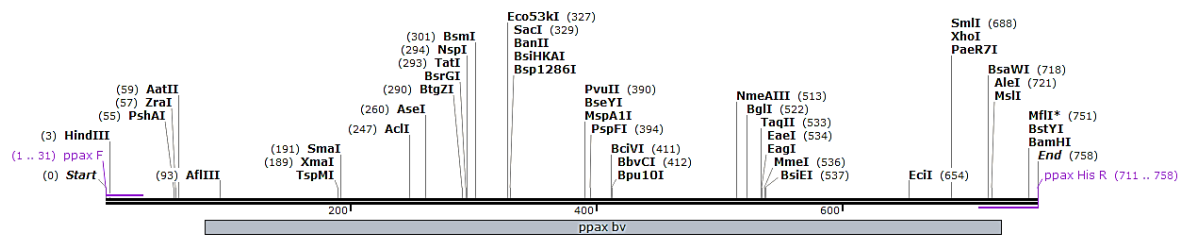


Figure 53: Carte de restriction du produit de PCR du gène entier *ppaX* amplifié par les amorces *ppaxGSTF* et *ppaxGSTR* (731-pb)



Figure 54: Séquence nucléotidique du produit PCR du gène entier *ppaX* amplifié par les amorces *ppaxGSTF* et *ppaxGSTR* (731-pb)



Amplified ppax for puc19 polyhistidine
758 bp

Figure 55: Carte de restriction du produit de PCR du gène entier *ppaX* amplifié par les amorces *ppaxF* et *ppax HISTR* (758-pb)

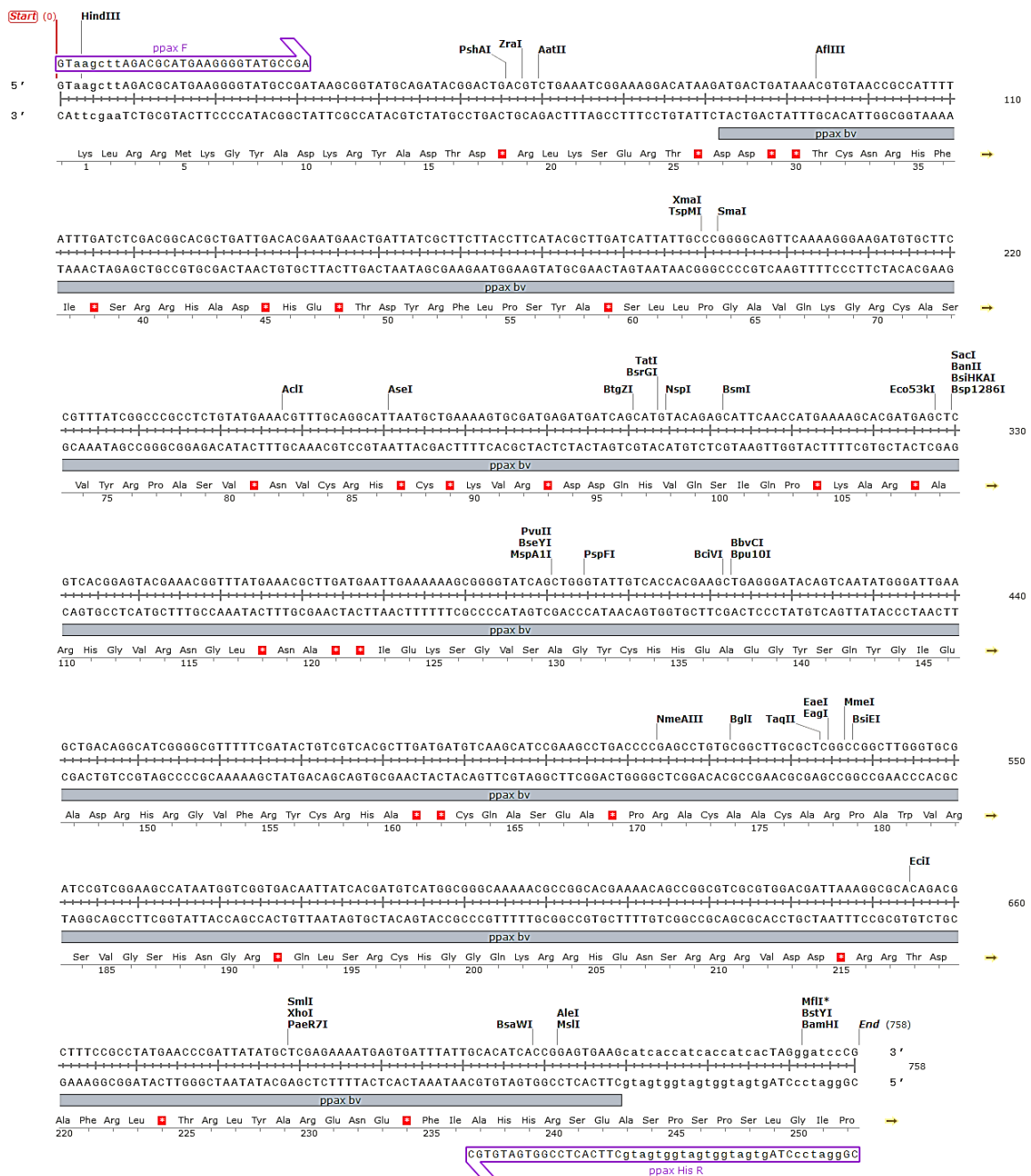


Figure 56: Séquence nucléotidique du produit de PCR du gène entier *ppaX* amplifié par les amorces *ppaxF* et *ppax HISTR* (758-pb)

VII.1. Alignement des séquences nucléotidiques des *produits de séquençage*

CLUSTAL O (1.2.4) multiple sequence alignment

| | | |
|------|--|-----|
| DN74 | CAACCGGGGAGGGTCATTGGAAACTGGGGAAGCTGAGTGCAGAGAGGAGAGTGAATTC | 60 |
| QA2 | -----CAGC-----GGTATGCCGACACKG-----ACTGA | 24 |
| Z16 | -----AGC-----GGTATGCTGACACGG-----ACTGA | 23 |
| DN59 | -----GTATGCCGATAGC-----GGTATGCCGACACGG-----ACTGA | 33 |
| | * * * * * | |
| DN74 | CACGTGTAGCGGTGMAMTSCGTAG-----WGATGTGCR-AKRAATCACTCATTKTSKCG | 113 |
| QA2 | CGCTGAAATCGGAAMGAC-ATWAGATGACTGAT--AAACGTGTAMCGCCATTTTATTTC | 81 |
| Z16 | CGACTGAAATCGGAAAGGACATAAGATGACTGATAAACCTGTAACCCGCAATTTATTTC | 82 |
| DN59 | CGCTGAAATCGGAAAGGACATAAGATGACTGATAAACCTGTAACCCGCAATTTATTTC | 93 |
| | * | |
| DN74 | ARSRYAKAMTCGGGTTCATRGKCKGWAASSTGACKCTGWSASCTKWAACKGTCASGSGA | 173 |
| QA2 | ATCTCGACGGCACGCTGATTGACACGAATGAA-----CTGATTAT | 121 |
| Z16 | ATCTCGACGGCACGCTGATTGACACGAATGAA-----CTGATTAT | 122 |
| DN59 | ATCTCGACGGCACGCTGATTGACACGAATGAA-----CTGATTAT | 133 |
| | * | |
| DN74 | CGCSRRKWKWTMGATRCCGSYGKTKWTKSCMCGCCRTARACGA-----TGMG | 221 |
| QA2 | CGCTTCTTACCTTTCATACGCTTGATCATKATTTGCCCGRGGCAGTTCAAAGSGAAGATG | 181 |
| Z16 | CGCTTCTTACC-TTCATACGCTTGATCATATTGCCCGGGCAGTTTAAAGGGGAAGATG | 181 |
| DN59 | CGCTTCTTACC-TTCATACGCTTGATCATATTGCCCGKGGCAGTTCAAAGSGAAGATG | 192 |
| | * | |
| DN74 | TG-----MTAAKTGTAGGGGGTTTCCGMCCMTTAKKGCTKCAGCK | 262 |
| QA2 | TGCTTCCGTTTATCGGGCCCGCCTCTGTATGAAACGTTTTTC-AGGCATTAATGCTGA-AAA | 239 |
| Z16 | TGCTTCCGTTTATCGGGCCCGCCTCTGTATGAAACGTTTTTC-AGGCATTAATGCCGA-AAA | 239 |
| DN59 | TGCTTCCGTTTATCGGGCCCGCCTCTGTATGAAACGTTTTTC-AGGCATTAATGCTGAAAAA | 251 |
| | * | |
| DN74 | AACGSATTAMGCACYCAMGCCCTGGGSWGTACGGTCGCAAGACTGAAACKCAMAGGAAAYTG | 322 |
| QA2 | GTGCGATGAGA-TGATCAGCATGTACAGAGCAT--TCAACCATGAAAAGCACG--ATGAG | 294 |
| Z16 | GTGCGATGAGA-TGATCAGCATGTACAGAGCAT--TCAACCATGAAAAGCACG--ATGAG | 294 |
| DN59 | GTGCGATGAGA-TGATCAGCATGTACAGAGCAT--TCAACCATGAAAAGCACG--ATGAG | 306 |
| | * | |
| DN74 | ACGGGGKMSGCTWCGGA-WGCKKTRSAKCATSWRGYKTRATTCGACAGCWACKCGAAGA | 381 |
| QA2 | CTCGTACGGAGTACGAAACGGTTTATGAAACGCTGGATGAATTGAAAAAAGCGG----G | 350 |
| Z16 | CTCGTACGGAGTACGAAACGGTTTATGAAACGCTGGATGAATTGAAAAAAGCGG----G | 350 |
| DN59 | CTCGTACGGAGTACGAAACGGTTTATGAAACGCTGGATGAATTGAAAAAAGCGG----G | 362 |
| | * | |
| DN74 | AMCTKMCCMRGTGCTGACATCMKCTKCAATCCCATAKWGAYWGKATCCSTCMSCCTTCG | 441 |
| QA2 | ATATAAGTCCGGTATTGTC-----ACCACGAAGCTGAGGGATACAGTCAATATGC | 400 |
| Z16 | CTATCAGCTTGGTATTGTC-----ACCACGAAGCTGAGGGATACAGTCAATATGC | 400 |
| DN59 | ATATAAGTCCGGTATTGTC-----ACCACGAAGCTGAGGGATACAGTCAATATGC | 412 |
| | * | |
| DN74 | KGGKSASARTRMCGAGCKTAKRTCCCGCWTKKTTSWMKTCATSCAKCGTKTCRTRARMYG | 501 |
| QA2 | GATTGAAGCTGACAGGCATC-----GGGGCGTTTTTTCGATACGTGCTCGTACCGCT | 449 |
| Z16 | GATTGAAGCTGACAGGCATC-----GGGGCGTTTTTTCGATACGTGCTCGTACCGCT | 449 |
| DN59 | GATTGAAGCTGACAGGCATC-----GGGGCGTTTTTTCGATACGTGCTCGTACCGCT | 461 |
| | * | |
| DN74 | TTKS---GTTAASTCCCGYRACGAGCKCAWCGTGCTYTTTSATSKTWGWATGCTCWGTACA | 558 |
| QA2 | TGATGATGATAAAGCATCCGAAGCCTGACCCCGAGCCTGTGCGGCTTGCGCTCAG----- | 503 |
| Z16 | TGATGATGATAAAGCATCCGAAGCCTGACCCCGAGCCTGTGCGGCTTGCTCTCAG----- | 503 |
| DN59 | TGATGATGATAAAGCATCCGAAGCCTGACCCCGAGCCTGTGCGGCTTGCGCTCAG----- | 515 |
| | * | |
| DN74 | TGCTGATCATSTYAKSGCACTTYTMA-GCRTKAMTGCCGGTGACAAACGTTTCRKASRRA | 617 |
| QA2 | -CCGGCTTGGGTGCGATCCGTCGGAAGCCATAATGGTCGGTGACAATATACAGATGTCA | 562 |
| Z16 | -ACGGCTTGGGTGCGATCCGTCGGAAGCCATAATGGTCGGTGACAATATACAGATGTCA | 562 |
| DN59 | -CCGGCTTGGGTGCGATCCGTCGGAAGCCATAATGGTCGGTGACAATATACAGATGTCA | 574 |
| | * | |
| DN74 | GGYGGGCGGATARACGKMARMWCATCATKCCCTTWTGAMCTGGGCTACACMCGKGCWAY | 677 |
| QA2 | TGGCGGGCAAAAACGCCCGGCACGAAAA-----CAGCCGGCGTGC | 601 |
| Z16 | TGGCGGGCAAAAACGCCCGGCACGAAAA-----CAGCCGGCGTGC | 601 |
| DN59 | TGGCGGGCAAAAACGCCCGGCACGAAAA-----CAGCCGGCGTGC | 613 |
| | * | |
| DN74 | AATGGACAGAWCAAAGGGCAGCGAWACCGYARGKTAAGCCAATSCSACWAAT-CTGTTTC | 736 |
| QA2 | CGTGGACGATTAAGGTGCACAGACACT-----TTCCGCTATGAACCCGATTATATGC | 655 |
| Z16 | CGTGGACGATTAAGGTGCACAGACACT-----TTCCGCTATGAACCCGATTATATGC | 655 |
| DN59 | CGTGGACGATTAAGGTGCACAGACACT-----TTCCGCTATGAACCCGATTATATGC | 667 |
| | * | |
| DN74 | TCAGT---TCGGATCKCAGTSTGCAACTCGACTGCGTGMGCTSGAGATCARMTAGWAAT | 793 |
| QA2 | TCGAGAAAATGAGTGATTATTGCACATCACCGGAGTGAAGTAATCCGTGAGAAAAA--- | 712 |
| Z16 | TCGAGAAAATGAGTGATTATTGCACATCACCGGAGTGAAGTAACCCGTGAGAAAAA--- | 712 |
| DN59 | TCGAGAAAATGAGTGATTATTGCACATCACCGGAGTGAAGTAATCCGTGAGAAAAA--- | 724 |
| | * | |
| DN74 | SGCGGATYAGCATGCCGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTGTACACA | 840 |
| QA2 | --CAGAC-----CGCCATCCGTTTCAGTGC AAAATACC-- | 744 |
| Z16 | --CAGAC-----CGCCATCCCT----- | 726 |
| DN59 | --CAGAC-----CG----- | 731 |
| | * * * * * | |

Figure 57: Alignement des séquences du gène *ppaX* des quatre souches de *B. velezensis* (QA2, Z16, DN59 et DN74) par Cluster Omega Multiple Alignment



Figure 58: Alignement des séquences du gène ppaX des quatre souches de *B. velezensis* (QA2, Z16, DN59 et DN74) par Tcoffee

T-COFFEE, Version_11.00 (Version_11.00)

Cedric Notredame

SCORE=74

*

BAD AVG GOOD

*

unculturedbacte : 27
Bacillussubtili : 81
Bacillusvelezen : 82
QA2 : 78
Z16 : 82
DN59 : 77
cons : 7

unculturedbacte SLAYIVFVQLLGVDEAF-----
Bacillussubtili MSDKQVTTILFDLDGTLINTNELIIASFLHTLEHYYP SKYKREDVLAFIGPSLFETFSSMDDP
Bacillusvelezen MTDKRVTAILFDLDGTLIDTNELIIASYLHTLDHYCPGQFKREDVLPFIGPPLYETFSGINAE
QA2 -----
Z16 MTDKHVTAILFDLDGTLIDTNELIIASYLHTLDHYCPGQFKREDVLPFIGPPLYETFSGINAE
DN59 MCFR-----LSARL-----CMKRFQALMLK
cons

unculturedbacte -----Q--VVATFALGASSIALFARIGGGIYTKAADV
Bacillussubtili KCEDMIAMYRAYNHDMHDSLVT EYETVYETLDALKKAGFTLGIVTTKLRDVTNMGLKLTGIGE
Bacillusvelezen KCDEMI SMYRAF NHEKHDELVT EYETVYETLDELKKAGYQLGIVTTKLRDVTNMGLKLTGIGA
QA2 ----MISMYRAF NHEKHDELVT EYETVYETLDELKKAGYKLGIVTTKLRDVTNMGLKLTGIGA
Z16 KCDEMI SMYRAF NHEKHDELVT EYETVYETLDELKKAGYQLGIVTTKLRDVTNMGLKLTGIGA
DN59 KCDEMI SMYRAF NHEKHDELVT EYETVYETLDELKKAGYKLGIVTTKLRDVTNMGLKLTGIGA
cons

unculturedbacte GADLVGK-VEAGIPEDDPRNPA-----TIADNVGDVGDVA-GMGADLF-ESYAGSI
Bacillussubtili FFETVVTLDDVTNAKPDPE-PVLLALKQLGSKPEEAIMVGDNYHDVLAGKNAGTKTAGVAWTI
Bacillusvelezen FFDTVVTLLDDVKHHPKPDPE-PVRLALSRLGCDPSEALMVGDNVHDVMAGKNAGTKTAGVAWTI
QA2 FFDTVVTLLDDVKHHPKPDPE-PVRLALSRLGCDPSEALMVGDNVHDVMAGKNAGTKTAGVAWTI
Z16 FFDTVVTLLDDVKHHPKPDPE-PVRLALSRLGCDPSEALMVGDNVHDVMAGKNAGTKTAGVAWTI
DN59 FFDTVVTLLDDVKHHPKPDPE-PVRLALSRLGCDPSEALMVGDNVHDVMAGKNAGTKTAGVAWTI
cons

unculturedbacte IAPMVLAAALFGGVQSGGALVDQFSSLQQATFLFPLFVGA VMVAS
Bacillussubtili KGPEMLAKH-----EPDFMLEKMSDLLQIVGVK-----
Bacillusvelezen KGAQTLSAY-----EPDYMLEKMSDLLHITGVK-----
QA2 KGAQTLSAY-----EPDYMLEKMSDLLHITGVK-----
Z16 KGAQTLSAY-----EPDYMLEKMSDLLHITGVK-----
DN59 KGAQTLSAY-----EPDYMLEKMSDLLHITGVK-----
cons

Figure 60: Alignement des séquences protéiques *PPase* codée par l'ORF *pSR8* et celles des souches de *B.subtilis*, *B.velezensis*, *QA2*, *Z16* et *DN59* par Expresso, TCoffee



Mémoire de Projet de Fin d'Etudes
Master en Sciences
Spécialité :
Biotechnologie Médicale
Soutenu le 02 Octobre 2021,
par Ihsane HALOUM

**Caractérisation et distribution du gène *ppaX*,
impliqué dans la résistance à la salinité chez *Bacillus velezensis***

Face à la salinité, les rhizobactéries viennent au secours des plantes, en réduisant les effets néfastes de ce stress abiotique. En s'appuyant sur l'hypothèse que la résistance à la salinité est assurée par une protéine, ce mémoire a pour objectif d'étudier la distribution et la caractérisation du gène qui code cette protéine ; grâce au test de salinité effectué chez quatre souches de *Bacillus velezensis* issues de diverses niches écologiques, en mettant en pratique l'intérêt de la PCR pour amplifier ce gène, puis établir sa séquence et en concevant des modèles expérimentaux visant : (1) le clonage du gène *ppaX* et la vérification de sa capacité d'induire la résistance à la salinité chez *E.coli*, (2) la mutation du gène *ppaX* de *Bacillus velezensis* et la vérification à nouveau de sa résistance à la salinité ; (3) l'expression, la production et la purification des pyrophosphatases recombinantes et leurs anticorps correspondants ainsi que l'étude de leurs interactions protéiques. Les résultats obtenus suggèrent que ses souches ont toléré les faibles concentrations en NaCl qui ont induit leur croissance ; cependant ces bactéries ont résisté aux fortes concentrations en NaCl et s'y sont adaptées plus ou moins difficilement. Suite à la PCR, le gène *ppaX* a été révélé chez les quatre souches. Les alignements nucléotidique et peptidique ont permis de détecter une certaine « conservation » des séquences *ppaX* et *Ppases* chez les différentes souches étudiées. En perspectives, ces résultats et modèles expérimentaux pourront être exploités dans l'étude fonctionnelle du gène *ppaX*.

Mots-clés : *Bacillus velezensis*, Biocontrôle, Halotolérance, PGPR, *ppaX*, Résistance, Salinité.