



HAL
open science

Exploration et exploitation de la diversité des Streptomyces : vers une meilleure compréhension de l'évolution des populations bactériennes

Cyril Bontemps

► **To cite this version:**

Cyril Bontemps. Exploration et exploitation de la diversité des Streptomyces : vers une meilleure compréhension de l'évolution des populations bactériennes. Bactériologie. Université de Lorraine, 2022. tel-03712644

HAL Id: tel-03712644

<https://hal.science/tel-03712644>

Submitted on 4 Jul 2022

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

Université de Lorraine
Ecole Doctorale SIReNa
« Sciences et Ingénierie des Ressources Naturelles »

Habilitation à Diriger des Recherches

**Exploration et exploitation de la diversité des *Streptomyces* :
vers une meilleure compréhension de l'évolution des
populations bactériennes**

Présenté par

Cyril Bontemps

Maître de conférences - Université de Lorraine
Laboratoire Dynamique des Génomes et Adaptation Microbienne
UMR1128 UL-INRAE

Soutenue le 9 juin 2022

Jury composé de :

Mme Christine Citti	Directrice de recherche ENVT, Toulouse	Rapportrice
M. Philippe Normand	Directeur de recherche CNRS, Lyon	Rapporteur
M. Jean-Luc Pernodet	Directeur de recherche CNRS, Paris-Saclay	Rapporteur
M. Francis Martin	Directeur de recherche INRAE, Nancy	Examineur
Mme Claire Prigent-Combaret	Directrice de recherche CNRS, Lyon	Examinatrice
M. Pierre Leblond	Professeur Université de Lorraine, Nancy	Examineur

« Je ne ferais pas ça tous les jours »

Marie-Pierre Casey

Remerciements

Si l'on dit souvent que la rédaction d'une HDR est un moment d'introspection et de réflexion sur son parcours scientifique, je dois dire que cela est particulièrement vrai au moment d'écrire ces quelques lignes. Sans en faire le compte, ce mémoire résume en effet quelques années de recherche qui, si elles sont passées très vite, n'auraient pas été possibles sans l'aide et le soutien d'une multitude de gens. La recherche, contrairement à la méditation, l'onanisme ou le macramé n'est définitivement pas une activité solitaire ! N'étant ni magasinier, ni Prévert je ne me risquerai donc pas à tenter un quelconque inventaire de collègues, de mentors, de techniciens, d'étudiants, de stagiaires, d'administratifs... qui ont croisé ma route et permis d'avancer au quotidien. Sachez néanmoins que l'écriture de ce manuscrit m'a globalement rappelé plus de bons souvenirs que de mauvais, signe qu'être scientifique reste un métier certes particulier et exigeant, mais toujours intéressant. Bref, je suis bien content d'en être arrivé là et pourvu que ça dure.

Néanmoins...

Je voudrais remercier Christine Citti, Philippe Normand et Jean-Luc Pernodet d'avoir accepté de rapporter ce manuscrit ainsi que Francis Martin et Claire Prigent-Combaret de l'avoir examiné.

Merci également à Pierre Leblond, mon parrain pour l'occasion, pour l'accompagnement scientifique stimulant et l'aide apportée au cours de ces déjà quelques années et je n'en doute pas pour les prochaines.

Merci à tous les membres du Laboratoire Dynamic et notamment à ceux de l'équipe StrAda qui participent à la bonne ambiance du laboratoire et permettent de travailler au quotidien dans de bonnes conditions. Si vous trouvez cette partie « un peu light », je vous invite à relire le premier paragraphe.

Et parce qu'il n'y a pas que le travail et qu'au final ça fait un grand tout, merci à ma famille et à mes proches.

Résumé

Les *Streptomyces* sont des bactéries sporulantes et filamenteuses ubiquistes des sols. Caractérisées par un large chromosome linéaire, elles sont également connues pour produire de nombreux métabolites spécialisés aux rôles écologiques variés. Mes activités de recherche au Laboratoire DynAMic ont principalement porté sur l'analyse et l'exploitation de la diversité de *Streptomyces* isolées à partir de micro-habitats de sol forestier. En comparant les génomes de souches d'une population rhizosphérique (isolats sympatriques et quasiment non différenciables au niveau intraspécifique), nous avons pu mettre en évidence la présence de nombreux gènes variables entre elles. Ces présences/absences de gènes (pouvant représenter plusieurs pourcentages du génome) reflètent des phénomènes évolutifs intenses sur des temps très courts et ont pour conséquence une différenciation fonctionnelle des souches de la population. En continuité de ces résultats, le projet que je propose se concentrera sur l'analyse des populations de *Streptomyces* comme unités évolutives et fonctionnelles dans l'environnement au travers d'approches expérimentales et de génomique. Il visera à mieux caractériser l'impact du transfert horizontal de gènes et notamment l'influence d'éléments conjugatifs et leur potentiel à recruter en trans des marqueurs chromosomiques concomitamment à leur transfert. Au niveau écologique, les influences réciproques pouvant exister entre des populations de *Streptomyces* avec d'autres acteurs de leur environnement (par ex. la plante) seront également étudiées. Des expériences innovantes d'évolution expérimentale seront notamment développées pour répondre à ces questions

Abstract

Streptomyces are ubiquitous spore-forming and filamentous soil bacteria. Characterised by a large linear chromosome, they are also known to produce numerous specialised metabolites with varied ecological roles. My research activities at the DynAMic Laboratory have mainly focused on the analysis and exploitation of the diversity of *Streptomyces* isolated from forest soil microhabitats. By comparing the genomes of strains from a rhizosphere population (sympatric isolates that are virtually indistinguishable at the intraspecific level), we were able to reveal the presence of numerous variable genes between them. These presence/absence of genes (which can represent several percentages of the genome) reflect intense evolutionary processes over very short periods of time and result in a functional differentiation of the strains in the population. In continuity with these results, the project I propose will focus on the analysis of *Streptomyces* populations as evolutionary and functional units in the environment through experimental and genomic approaches. It will aim to better characterise the impact of horizontal gene transfer and in particular the influence of conjugative elements and their potential to recruit chromosomal markers in trans concomitantly with their transfer. At the ecological level, the reciprocal influences that may exist between *Streptomyces* populations and other actors in their environment (e.g. the plant) will also be studied. Innovative experimental evolution experiments will be developed to answer these questions

Abréviations

A2F : Agronomie, Agroalimentaire, Forêt

ACT : Autorisation à co-diriger une thèse

AICE : Actinomycete integrative and conjugative element

ANI : Average nucleotide diversity

BGC : Biosynthetic gene cluster

CM : Cours Magistral

CDS : Coding sequence

CNAP : Centre for Novel Agricultural Products

DEA : Diplôme d'études approfondies

DR : direct repeat

Dr : Directeur/Directrice

DynAMic : Dynamique des génomes et adaptation microbienne

ICE : Integrative and conjugative element

Indel : insertion/deletion

Kb : kilobases

LIPM : Laboratoire des interactions plantes-microorganismes

LSTM : Laboratoires des symbioses tropicales et méditerranéennes

Mb : Mégabases

MC/MCU : Maitre de conférences

MLST : Multi locus sequence typing

Pb : paire de base

PFGE : Pulsed Field Gel Electrophoresis

Pr : Professeur

T4SS : Type four secretion system

TD : Travaux dirigés

TIR : Terminal inverted repeat

TMC : transfert de marqueurs chromosomiques

TP : Travaux pratiques

SNP : Single nucleotide polymorphism

Table des matières

Curriculum vitae	p.1
CV synthétique.....	p.2
Activité d'enseignement.....	p.3
Activités d'encadrement	p.4
Expertise, responsabilités et rayonnement scientifiques	p.6
Production scientifique	p.8
Activité pédagogique	p.13
Présentation de l'activité d'enseignement	p.14
Encadrement et évaluation de stagiaires	p.15
Responsabilités pédagogiques et formations	p.15
Synthèse des activités de recherche	p.16
1. Doctorat : Exploration de la diversité des rhizobia : nouveaux outils et concepts	p.17
1.1 Thématique et problématiques de la thèse	p.17
1.2 Caractérisation des premiers β -rhizobia	p.18
1.3 Développement d'une puce ADN pour la détection et la caractérisation symbiotique des rhizobia	p.19
2. Stage post-doctoral: In search of β -rhizobia	p.20
2.1 Thématique et problématiques	p.20
2.2 Projets parallèles : Etude de la diversité symbiotique de légumineuses chinoises	p.22
3. Stage post-doctoral: The molecular biology of nitroamine degradation in soils	p.22
4. Activités de recherche en tant que Maître de conférences	p.23
4.1 Exploration de la diversité des <i>Streptomyces</i> dans l'écosystème forestier	p.24
4.1.1 Les <i>Streptomyces</i>	p.24
4.1.2 Diversité taxonomique et fonctionnelle des <i>Streptomyces</i> à l'échelle de l'écosystème forêt	p.25
4.1.3. Etude de la diversité des <i>Streptomyces</i> à l'échelle d'une population	p.26
4.2 Exploitation de la diversité des <i>Streptomyces</i>	p.34
4.2.1 Développement de biosenseurs de la dégradation du bois	p.34
4.2.2 Coculture et biomolécules	p.36
4.3 Projets connexes	p.39
Projet	p.40
1. Projet dans le contexte du laboratoire	p.41
2. Le transfert d'AICE est-il un moteur de la diversité des <i>Streptomyces</i> ?	p.42
2.1 Contexte	p.42
2.2 Evaluation du transfert de marqueurs chromosomiques par les AICE	p.43
3. Vers une meilleure compréhension des populations par analyse génomique	p.45
3.1 Concept de population bactérienne	p.45
3.2 Analyse génomique des populations sans <i>a priori</i>	p.46
3.3 Analyse de BGC comme points chauds de recombinaison	p.48
4. Population et écologie : interconnexion entre population bactérienne et plante	p.50
5. Evolution expérimentale de populations de <i>Streptomyces</i>	p.52
6. Conclusion du projet	p.54
Bibliographie	p.55

Curriculum vitae

CV synthétique

Cyril Bontemps

Né le 12/07/1977

cyril.bontemps@univ-lorraine.fr

Tél. 03 72 74 51 90

Etablissement : Université de Lorraine

Adresse professionnelle :

Laboratoire DynAMic UMR1128 UL-INRA

Faculté des Sciences et Technologies,

B^{vd} des Aiguillettes BP70239 54506

Vandœuvre-lès-Nancy

Déroulé de carrière

Maître de conférences (depuis Oct. 2009) Université de Lorraine, Nancy, Laboratoire DynAMic, UMR UL-INRA 1128, DU Bertrand Aigle, Equipe StrAdA Dr. P. Leblond jusqu'en 2021 et Cyril Bontemps depuis janvier 2022

Postdoctorat (Avr.2008-Sep.2009), University of York (Angleterre).
Dr. de projet : Neil Bruce

Postdoctorat (Avr.2006-Mar.2008), University of York (Angleterre).
Dr. de projet : Peter Young

Doctorat en Ecologie Microbienne (Oct. 2001-Dec. 2005) de l'Université C. Bernard Lyon I (mention très honorable), réalisé au LIPM Toulouse (INRA) et au LSTM Montpellier (IRD).
Dr. Catherine Boivin-Masson.

DEA en Ecologie Microbienne (2001) Université C. Bernard Lyon I, réalisé au LSTM Montpellier (IRD)

Encadrement

Co-directeur ou co-encadrant de 5 thèses

16 stagiaires de niveaux Licence et Master

Production scientifique

36 articles scientifiques

1 brevet international

21 communications associé (poster/oral) depuis 2012

<https://scholar.google.com/citations?user=rcxikucAAAJ/>

<https://cv.archives-ouvertes.fr/cyril-bontemps>

Responsabilités

Responsable Equipe StrAdA (depuis janvier 2022)

Référent Europe d'Unité du département MICA pour le laboratoire Dynamic

Co-porteur d'un WP du futur projet Biomolécule (LUE)

Membre élu du pôle scientifique A2F (Université de Lorraine) (2018-2021)

Activités d'enseignement

Présentation synthétique des enseignements

Mon activité d'enseignement est effectuée à la faculté des Sciences et Techniques de Vandœuvre-lès-Nancy (Université de Lorraine). Mes cours sont axés sur différentes disciplines de la microbiologie, l'écologie microbienne et la biologie évolutive et vont de la première année de licence des sciences du vivant, jusqu'au master de Microbiologie. Ma charge d'enseignement est en moyenne de 235 H équivalent TD par an et se répartie environ en 20 % en cours magistraux (CM), 20 % en travaux dirigés (TD) et 60 % en travaux pratiques (TP). Je participe également à l'encadrement de projets tutorés en Master de microbiologie.

Le tableau ci-dessous répertorie mes enseignements sur la dernière habilitation.

Matière	Niveau	Nb d'étudiants	Type de cours	Volume horaire par an
Microbiologie	L1	400-500	CM	15H
Ecologie Microbienne *	L2	80-100	CM/TD/TP	60H
Interactions bactéries/animaux	L3	30-50	CM/TD/TP	16H
Biologie évolutive	L3	200-250	TD/TP	55H
Bactériologie/mycologie/virologie*	M1 Microbiologie	50	CM/TD	7H
Techniques de Microbiologie	M1 Microbiologie	50	TD/TP	15H
Mise en situation expérimentale	M1 Microbiologie	12-15	Projets tutorés	70H

* Responsable d'UE

Responsabilités pédagogiques

Responsable des unités d'enseignements (UE) Ecologie Microbienne en L2 et Bactériologie/mycologie/virologie en M1. J'étais, lors de la précédente habilitation, également responsable de l'UE systématique et diversité des microorganismes (L3).

Membre du jury d'évaluation des stages de L3 (2 jours) où les étudiants (environ 80 par an) présentent un rapport de stage sous forme de poster.

Membre de jurys de soutenance de stage : je participe à un/deux jurys par an de soutenances de stage d'étudiants du master microbiologie.

Enseignant référent en L1 : Je suis au cours de leur première année un groupe d'une vingtaine d'étudiants afin de les diriger dans leur orientation, leurs méthodes de travail et les aide s'ils rencontrent des problèmes (orientation, échec aux examens...).

Activités d'encadrement

Co-direction de thèses

J'ai participé à la co-direction de 4 thèses à hauteur de 50% ou 33% qui ont été soutenues entre 2018 et 2020 et participe actuellement à l'encadrement d'une cinquième thèse dont la soutenance est prévue pour 2022.

Doctorant.e	Encadrement	Co-encadrant	Financement	Début	Fin
Maxime Toussaint	50 %	Pierre Leblond	Labex Arbre / Région Lorraine	10/2013	02/2018
Jodelle Degois	33 % (sans ACT)	Pierre Leblond & Philippe Duquenne (INRS)	INRS	01/2015	02/2018
Abdoul Razak Tidjani	50 %	Pierre Leblond	MENRT	10/2016	12/2019
Matthieu Nicault	33 % (sans ACT)	Pierre Leblond & Eric Gelhaye (IaM)	LUE (Lorraine Université d'Excellence)	10/2017	11/2020
Caroline Choufa	50 %	Pierre Leblond	Labex Arbre / Région Lorraine	10/2018	En cours

Publications associées aux encadrements

Maxime Toussaint : 3 publications + 1 brevet international

Jodelle Degois : 3 publications

Abdoul Razak Tidjani : 5 publications

Matthieu Nicault : 3 publications

Autre encadrement

En 2020, j'ai co-encadré, avec Pierre Leblond, Manar Arab, en demi-ATER au laboratoire.

Encadrement de stagiaires

Entre 2010 et 2021, j'ai encadré ou co-encadré 16 stages de Master et de Licence. Le détail de ces encadrements est synthétisé dans le tableau ci-après.

Nom	Année	Durée	Diplôme	Niveau encadrement	Sujet
Pierre-Vincent Revol	2011	6 mois	M2	100%	Caractérisation taxinomique et fonctionnelle d'une population de <i>Streptomyces</i> isolée d'un sol forestier
Maxime Toussaint	2013	6 mois	M2	100%	Développement d'un biosenseur bactérien de la dégradation du bois
Rémy Dulongcourty	2010	2 mois	M1	100%	Etude des interactions biotiques et de l'influence du bois entre la bactérie <i>Streptomyces ambofaciens</i> et le champignon (lignivore) <i>Phanerochaete chrysosporium</i> .
Mathilde Jeanbille	2011	2 mois	M1	100%	Etude des capacités cellulolytiques d'une population d'Actinomycètes isolée de sol forestier et préparation à l'analyse phylogénétique
Maxime Toussaint	2012	2 mois	M1	50% avec Damien Blaudez	Etude de la résistance aux métaux de <i>Streptomyces</i> et influence de la bactérie sur la croissance de <i>Paxillus involutus</i> et la mycorhization
Louis Hermon	2013	2 mois	M1	50% avec Damien Blaudez	Identification moléculaire et mise en évidence des propriétés PGPR de souches bactériennes isolées de sols pollués par les métaux lourds
Rachida Baamr	2014	2 mois	M1	100%	Création d'une collection d'Actinomycètes à partir de micro-habitats du sol et étude de son résistome
Laura Didierjean	2015	2 mois	M1	100%	Etude d'interactions entre micro-organismes au sein d'un même micro-habitat
Antonin Ribeyre	2015	2 mois	M1	100 %	Caractérisation Taxonomique et Fonctionnelle de Bactéries issues de Micro-habitats d'un Sol Forestier
Noémie Detto	2016	2 mois	M1	100%	Caractérisation des interactions existant entre les bactéries d'un même microhabitat
Isabelle Canihac	2018	2 mois	M1	50% avec Aurélie Deveau	Recherche d'activités antimicrobiennes et herbicides chez des bactéries du microbiome de la truffe
Antoine Persoons	2010	2 mois	L3	100%	Expression différentielle de <i>Streptomyces ambofaciens</i> et effet sur <i>Phanerochaete chrysosporium</i>
Yoann Perrin	2012	2 mois	L3	100%	Mise en place d'un protocole de MLST pour <i>Streptomyces</i> .
Maxime Bailly	2013	2 semaines	L3	50 % avec Maxime Toussaint	Développement d'un biosenseur bactérien de la dégradation du bois grâce à <i>Streptomyces ambofaciens</i> ATCC 2289
Nazim Sarica	2014	2 mois	L3	50 % avec Maxime Toussaint	Etude du résistome d'une communauté de <i>Streptomyces</i>
Sarah Denet	2021	2 mois	L3	100%	Etude de la synergie d'une population de <i>Streptomyces</i> sur des effets PGP

Expertise, responsabilités et rayonnement scientifiques

Expertises scientifiques

Expertise de projets : Rapporteur de 2 projets ANR (2017 et 2018), projet Labex Arbre (2017), projets A2F thèse/postdoc (2019,2021)

Rapporteur de 2 Doctorats : C. Bournaud, Université Montpellier2 (2012); A. Rahman, ENSAIA (2013).

Rapporteur de comité de sélection : ATER UL-Nancy (2012), MCU UL-Nancy (2014), MCU URCA-Reims (2017), avancement HC-MCU – UL (2019)

Membre du comité de pilotage de thèse : Mathieu Lhuire – INRA Champeoux 2015

Rapporteur pour les revues : *Molecular Ecology, Microbial Ecology, Plant and Soil, Planta, MDPI agriculture, genes, Folia microbiologica, AJMR, EJSOBI, FEMS Microbiol Ecology, MSphere, Scientific Report*

Responsabilités scientifiques

Responsable Equipe StrAdA depuis janvier 2022

Co-porteur d'un WP et membre du Copil du futur projet Biomolécule (LUE) depuis 2021

Référent Europe pour le département INRA MICA depuis 2016.

Membre élu pôle scientifique A2F – Université de Lorraine (2018-2021)

Présentations (invité) :

Streptomyces : Ecologie, génomique et applications. INRA/URCA laboratoire FARE. Reims 10/04/2017. Caroline Rémond.

Streptomyces: From genome dynamics to interactions in the ecosystem. The Vos lab. University of Exeter (UK). 03/07/17. Michiel Vos.

Vulgarisation scientifique

Communiqué de presse INRAE. Une bactérie du sol championne de l'évolution rapide, septembre 2019

Reportage Journal 12/13 France 3 Lorraine « Nouvelles découvertes autour des bactéries », Septembre 2019

Financements obtenus

Depuis mon recrutement, j'ai porté ou co-porté 12 projets de recherche (pour un total de 478 k€ incluant financement ou co-financement de thèses et salaire de techniciens) dans le cadre du Labex Arbre, de la Région Lorraine ou de Lorraine Université d'Excellence (LUE).

2010 : Projet jeune chercheur (Région Lorraine) – porteur – 5k€
2012 : Projet Streptosensor (Labex ARBRE)- porteur – 5k€
2013 : Projet EWoC (Labex ARBRE) - Co-porteur avec P. Leblond 65k€ (1/2 bourse doctorat)
2013 : Projet EWoC (BQR région Lorraine) – Co-porteur avec P. Leblond - 60k€ (1/2 bourse doctorat)
2013 : Projet Bactotruff (Labex ARBRE) – partenaire avec Aurélie Deveau (IaM-INRA) – 10 k€
2014 : Projet INABACT (Labex ARBRE) - responsable WP – 39k€ (CDD technicien). Porteur S. Uroz IaM
2015 : Projet SexSo (Labex ARBRE) – Co-porteur avec P. Leblond – 34k€
2016 : Projet thèse (LUE Impact « Biomolécules ») – Co-porteur avec P. Leblond & Eric Gelhaye (IaM)– 120k€ (bourse de thèse)
2018 : Projet Microtruf (LUE Impact « Biomolécules ») –Co-porteur avec A. Deveau (IaM-INRA)– 10k€
2018 : Projet Genthri (Labex Arbre) – Co-porteur avec P. Leblond – 50k€ (1/2 bourse doctorat)
2018 : Projet TransFR (Région Lorraine) – Co-porteur avec P. Leblond - 50 k€ (1/2 bourse doctorat)
2021 : Projet Me2 (Labex Arbre) -porteur avec P. Leblond -30k€

Collaborations scientifiques dans le cadre de projets

Michiel Vos, European Centre for environment & human health, Université d'Exeter dans le cadre de la thèse de Caroline Choufa.

Claire Fourrey, laboratoire IaM UMR1136, INRA Champenoux dans le cadre de la thèse de Caroline Choufa.

Eric Gelhaye, laboratoire IaM UMR1136, INRA Champenoux dans le cadre de la thèse de Matthieu Nicault.

Patrick Chaimbault, LCP-A2MC, Université de Lorraine, Metz dans le cadre de la thèse de Matthieu Nicault

Aurélie Deveau, Laboratoire IaM UMR1136, INRA Champenoux : projets labex et LUE endosymbiotes de la truffe

Marie-Pierre Turpault et Stéphane Uroz, Laboratoires BEF et IaM, INRA Champenoux : projet labex Inabact

Philippe Duquenne, Laboratoire de métrologie des aérosols, INRS Vandoeuvre-lès-Nancy dans le cadre de la thèse de Jodelle Degois

Arnaud Besserer et Philippe Gérardin LERMAB Epinal et Magdalena Kutnik, Institut Technologique FCBA Paris dans le cadre de la thèse de Maxime Toussaint

Collaborations en tant qu'expert (depuis 2009)

Sophie Gangloff : Laboratoire BIOS Université Reims

Frédéric Borges : ENSAIA Nancy

Production scientifique

Total : 36 articles et 1 brevet international

Profile google scholar : <https://scholar.google.com/citations?user=rcxikucAAAAJ>

Profile HAL : <https://cv.archives-ouvertes.fr/cyril-bontemps>

Publications

1. Vincent Burrus, **Cyril Bontemps**, Bernard Decaris and Gérard Guédon. Characterization of a novel type II restriction-Modification system, *Sth368I*, encoded by the integrative element *ICES1* of *Streptococcus thermophilus* CNRZ368. *Appl Environ Microbiol.* **2001** ; 67(4):1522-8. [IF=3.633]
2. Chen WM, Moulin L, **Bontemps C**, Vandamme P, Bena G and Boivin-Masson C. Legume symbiotic nitrogen fixation by beta-proteobacteria is widespread in nature. *J Bacteriol.* **2003** ; 185(24):7266-72. [IF=3.726]
3. **Cyril Bontemps**, Geoffroy Golfier, Carine Gris-Liebe, Sébastien Carrere, Luc Talini and Catherine Boivin-Masson. Microarray-based detection and typing of the rhizobium nodulation gene *nodC*: the potential of DNA arrays to diagnose biological functions of interest. *Appl Environ Microbiol.* **2005** ; 71(12):8042-8. [IF=3.633]
4. Catherine Boivin-Masson, **Cyril Bontemps**, Geoffroy Golfier, Carine Gris-Liebe and Luc Talini. Détection et typage du gène à l'aide de biopuces à ADN : perspectives pour l'étude de la diversité et de l'écologie moléculaire des rhizobia. *Les Actes du BRG*, **2006** ; (6) 97-110
5. Geoffrey Elliott, Wen-Ming Chen, **Cyril Bontemps**, Jui-Hsing Chou, J. Peter Young, J I Sprent and Euan James. Nodulation of *Cyclopia* spp. (Leguminosae, Papilionoideae) by *Burkholderia tuberum*. *Annals of Botany*, **2007** 100: 1403–1411. [IF=3.724]
6. Elliott GN, Chen WM, Chou JH, Wang HC, Sheu SY, Perin L, Reis VM, Moulin L, Simon MF, **Bontemps C**, Sutherland JM, Bessi R, de Faria SM, Trinick MJ, Prescott AR, Sprent JI and James EK. *Burkholderia phymatum* is a highly effective nitrogen-fixing symbiont of *Mimosa* spp. and fixes nitrogen ex planta. *New Phytol.* **2007** ; 173(1):168-80. [IF=6.140]
7. W.-M. Chen, S. M. de Faria, J.-H. Chou, E. K. James, G. N. Elliott, J. I. Sprent, **C. Bontemps**, J. P. W. Young and P. Vandamme. *Burkholderia sabiae* sp. nov., isolated from root nodules of *Mimosa caesalpinifolia*. *Int J Syst Evol Microbiol.* **2008** Sep;58 :2174-9. [IF=2.488]
8. Elliott GN, Chou JH, Chen WM, Bloemberg GV, **Bontemps C**, Martínez-Romero E, Velázquez E, Young JP, Sprent JI, James EK. *Burkholderia* spp. are the most competitive symbionts of *Mimosa*, particularly under N-limited conditions. *Environ Microbiol.* **2008** Nov 6. [IF=5.278]
9. Amadou C, Pascal G, Mangenot S, Glew M, **Bontemps C**, Capela D, Carrère S, Cruveiller S, Dossat C, Lajus A, Marchetti M, Poinot V, Rouy Z, Servin B, Saad M, Schenowitz C, Barbe V, Batut J, Médigue C, Masson-Boivin C. Genome sequence of the beta-rhizobium *Cupriavidus taiwanensis* and comparative genomics of rhizobia. *Genome Res.* **2008** Sep;18(9):1472-83. [IF=11.077]
10. Wei G, Chen W, Young JP, **Bontemps C**. A new clade of Mesorhizobium nodulating *Alhagi sparsifolia*. *Syst Appl Microbiol.* **2009** Feb;32(1):8-16. [IF=2.748]
11. Gehong Wei, Weimin Chen, Wenfei Zhu, Chun Chen, J Peter W Young, **Cyril Bontemps**. Invasive Robinia pseudoacacia in China is nodulated by Mesorhizobium and Sinorhizobium species that share similar nodulation genes with native American symbionts. *FEMS Microbiol Ecol.* **2009** Jun. [IF=3.885]

12. Chen W, Zhu W, **Bontemps C**, Young JP, Wei G
Mesorhizobium alhagi sp. nov., isolated from root nodules of the wild legume *Alhagi sparsifolia*. [Int J Syst Evol Microbiol](#). **2010** Apr 9. [IF=2.488]
13. Fabio Bueno dos Reis Jr, Marcelo F. Simon, Eduardo Gross, Robert M. Boddey, Geoffrey N. Elliott, Nicolau E. Neto, M. de Fatima Loureiro, Luciano P. de Queiroz, Maria Rita Scotti, Wen-Ming Chen, Agneta Noren, Maria C. Rubio, Sergio M. de Faria, **Cyril Bontemps**, Silvia R. Goi, J. Peter W. Young, Janet I. Sprent and Euan K. James. Nodulation and nitrogen fixation by *Mimosa* spp. in the Cerrado and Caatinga biomes of Brazil. [New Phytol](#). **2010**, Apr 186: 934–946. [IF=6.140]
14. **Bontemps C**, Elliott GN, Simon MF, Dos Reis Júnior FB, Gross E, Lawton RC, Neto NE, de Fátima Loureiro M, De Faria SM, Sprent JI, James EK, Young JP. Burkholderia species are ancient symbionts of legumes. [Mol Ecol](#). **2010** Jan;19(1):44-52. [IF=6.369]
15. Chen WM, Zhu WF, **Bontemps C**, Young JP, Wei GH. *Mesorhizobium camelthorni* sp. nov., isolated from *Alhagi sparsifolia* in northwestern China. [Int J Syst Evol Microbiol](#). **2011** Mar 61, 574–579. [IF=2.488]
16. Manoj Kumar Singh, Dhananjaya Pratap Singh, Sukumar Mesapogu, Bandamaravuri Kishore Babu, **Cyril Bontemps**. Concomitant colonization of nifH positive endophytic Burkholderia sp. in rice (*Oryza sativa* L.) promotes plant growth. [World J Microbiol Biotechnol](#) **2011** 27:2023–2031. [IF=2.100]
17. Gyaneshwar P, Hirsch AM, Moulin L, Chen WM, Elliott GN, **Bontemps C**, Estrada-de Los Santos P, Gross E, Dos Reis FB, Sprent JI, Young JP, James EK. Legume-nodulating betaproteobacteria: diversity, host range, and future prospects. [Mol Plant Microbe Interact](#). **2011** Nov;24(11):1276-88 [4.31]
18. Sheu SY, Chou JH, **Bontemps C**, Elliott GN, Gross E, James EK, Sprent JI, Young JP, Chen WM. Burkholderia symbiotica sp. nov., isolated from root nodules of *Mimosa* spp. native to North East Brazil. [Int J Syst Evol Microbiol](#). **2012** Sep; 62 (Pt 9): 2272-8 [IF=2.488]
19. Sheu SY, Chou JH, **Bontemps C**, Elliott GN, Gross E, Dos Reis Junior FB, Melkonian R, Moulin L, James EK, Sprent JI, Young JP, Chen WM. Burkholderia diazotrophica sp. nov., isolated from root nodules of *Mimosa* spp. [Int J Syst Evol Microbiol](#). **2013** Feb;63(Pt 2):435-41[IF=2.488]
20. **Bontemps C**, Toussaint M, Revol PV, Hotel L, Jeanbille M, Uroz S, Turpault MP, Blaudez D, Leblond P. Taxonomic and functional diversity of *Streptomyces* in a forest soil. **2013** [FEMS Microbiol Lett](#). May;342(2):157-67 [IF=2.723]
21. Rahman A, Cailliez-Grimal C, **Bontemps C**, Payot S, Chaillou S, Revol-Junelles AM, Borges F. High genetic diversity among strains of the unindustrialized lactic acid bacterium *Carnobacterium maltaromaticum* in dairy products as revealed by multilocus sequence typing. **2014** [Appl Environ Microbiol](#). Jul;80(13):3920-9. [IF=3.952]
22. Chong CS, Sabir DK, Lorenz A, **Bontemps C**, Andeer P, Stahl DA, Strand SE, Rylott EL, Bruce NC. Analysis of the xplAB-Containing Gene Cluster Involved in the Bacterial Degradation of the Explosive Hexahydro-1,3,5-Trinitro-1,3,5-Triazine. **2014** [Appl Environ Microbiol](#). Nov 1;80(21):6601-10. [IF=3.952]
23. **Bontemps C**, Rogel MA, Wiechmann A, Mussabekova A, Moody S, Simon MF, Moulin L, Elliott GN, Lacercat-Didier L, Dasilva C, Grether R, Camargo-Ricalde SL, Chen W, Sprent JI, Martínez-Romero E, Young JP, James EK. Endemic *Mimosa* species from Mexico prefer alphaproteobacterial rhizobial symbionts. [New Phytol](#). **2016** Jan;209(1):319-33 [IF=6.373]
24. Hoff G, Bertrand C, Zhang L, Piotrowski E, Chipot L, **Bontemps C**, Confalonieri F, McGovern S, Lecointe F, Thibessard A, Leblond P. Multiple and Variable NHEJ-Like Genes Are Involved in Resistance to DNA Damage in *Streptomyces ambofaciens*. [Front Microbiol](#). **2016** Nov 28;7:1901. [IF=4.165]
25. Toussaint M, **Bontemps C**, Besserer A, Hotel L, Gérardin P, Leblond P. Whole-cell biosensor of cellobiose and application to wood decay detection. [J Biotechnol](#). **2016** Dec 10;239:39-46. [IF=2.667]

26. Degois J, Clerc F, Simon X, **Bontemps C**, Leblond P, Duquenne P. First Metagenomic Survey of the Microbial Diversity in Bioaerosols Emitted in Waste Sorting Plants. *Annals of Work Exposures and Health*, **2017**, 1–11 [IF=1.743]
27. Benhadj M, Gacemi-Kirane D, Toussaint M, Hotel L, **Bontemps C**, Duval RE, Aigle B, Leblond P. Diversity and antimicrobial activities of *Streptomyces* isolates from Fetzara Lake, north eastern Algeria. *Ann Biol Clin (Paris)*. **2018** Jan 1;76(1):81-95. doi: 10.1684/abc.2017.1316. [IF=0.401]
28. Degois J, Simon X, **Bontemps C**, Leblond P, Duquenne P. Characterization of experimental complex fungal bioaerosols: Impact of analytical method on fungal composition measurements. *Aerosol Science and Technology*, **2019** 53:2, 146-159, DOI: 10.1080/02786826.2018.1557320 [IF=2.435]
29. Tidjani RA, Lorenzi JN, Toussaint M, van Dijk E, Naquin D, Lespinet O, **Bontemps C***, Leblond P*. Genome Sequences of 11 Conspecific *Streptomyces* sp. Strains. *Microb Resour Announc* 2019 8:38 [IF=1.3] * Co-corresponding authors
30. Tidjani RA, Lorenzi JN, Toussaint M, van Dijk E, Naquin D, Lespinet O, **Bontemps C***, Leblond P*. Massive gene flux drives genome diversity within a population of *Streptomyces*. *mBio*, **2019** 10:5 [IF=6.689]. * Co-corresponding authors
31. Colin M, Charpentier E, Klingelschmitt E, **Bontemps C**, De Champs C, Reffuveille F, Gangloff SC. Specific antibacterial activity of copper alloy touch surfaces in five long-term care facilities for older adults. *J Hosp infect*, **2020** 104: 283-292 DOI: 10.1016/j.jhin.2019.11.021 [IF=3.354].
32. Nicault M, Tidjani AR, Gelhaye E, **Bontemps C**, Leblond P. Genome Sequences of Five *Streptomyces* Strains Isolated at Microscale. *Microbiol Resour Announc*. **2020** 4;9(23) [IF=1.3]
33. Tidjani AR, **Bontemps C***, Leblond P*. Telomeric and sub-telomeric regions undergo rapid turnover within a *Streptomyces* population. *Sci Rep*. **2020** May 7;10(1):7720. doi: 10.1038/s41598-020-63912-w [IF=4.011] * Co-corresponding authors
34. Nicault M, Tidjani AR, Gauthier A, Dumarcay S, Gelhaye E, **Bontemps C**, Leblond P. Mining the Biosynthetic Potential for Specialized Metabolism of a *Streptomyces* Soil Community. *Antibiotics (Basel)*. **2020** 23;9(5):271. doi: 10.3390/antibiotics9050271. [IF=3.896]
35. Degois J, Simon X, Clerc F, Bontemps C, Leblond P, Duquenne P. One-year follow-up of microbial diversity in bioaerosols emitted in a waste sorting plant in France. **2021** *Waste Manag*. 1;120:257-268. doi: 10.1016/j.wasman.2020.11.036. [IF=5.448]
36. Nicault M, Zaiter A, Dumarcay S, Chaimbault P, Gelhaye E, Leblond P*, **Bontemps C***. Elicitation of Antimicrobial Active Compounds by *Streptomyces*-Fungus Co-Cultures. **2021** *Microorganisms*. 15;9(1):178. doi: 10.3390/microorganisms9010178 [IF=4.152] * Co-corresponding authors

BREVET

Brevet international

Bontemps C, Toussaint M, Leblond P.

BACTERIAL BIOSENSOR OF WOOD DEGRADATION

Pub. No.:WO/2016/131665, International Application No.PCT/EP2016/052417

Publication Date:25.08.2016

Communications depuis 2012

Posters

1. **Bontemps C**, Hotel L, Revol P-V, Jeanbille M, Uroz S, Turpault M-P, Leblond P,. Taxonomic and functional diversity of *Streptomyces* in a forest soil, Munster, Allemagne. 2012 [Poster]
2. **Bontemps C**, Hotel L, Revol P-V, Jeanbille M, Uroz S, Turpault M-P, Leblond P. Taxonomic and functional diversity of *Streptomyces* in a forest soil, Journées Actinomycètes, Nancy, France. 2012 [Poster]
3. Degois Jodelle, Clerc Frederic, Simon Xavier, **Bontemps Cyril**, Leblond Pierre, Duquenne Philippe : Bioaerosol biodiversity in waste sorting plant: feasibility and uncertainty measurement. European aerosol conference, Tours, 4th-9th september 2016. [Poster]
4. Matthieu Nicault, **Cyril Bontemps**, Éric Gelhaye and Pierre Leblond. Deciphering and exploiting bacteria-fungi dialogues to identify new bioactive metabolites. 12^{ème} rencontre de Phytopathologie et Mycologie. JJC Aussois 2018. [Poster]
5. Caroline Choufa, Abdoul Razak Tidjani, Claire Veneault-Fourrey, Michiel Vos, **Cyril Bontemps**, Pierre Leblond. Interplay between lateral gene transfer and rhizosphere functioning. Functional Ecology Conference. Nancy, France Dec 2018. [Poster]
6. Matthieu Nicault, **Cyril Bontemps**, Éric Gelhaye and Pierre Leblond Activation of cryptic antimicrobial compounds by microbial co-cultures. 8th Congress of European Microbiologists 7-11 July 2019 Glasgow, Scotland
7. Abdoul-Razak Tidjani, Jean-Noël Lorenzi, Olivier Lespinet, **Cyril Bontemps**, Pierre Leblond. Massive gene flux in bacterial population fuels adaptation to forest soil ecosystem. 15^{ème} congrès de la Société Française de Microbiologie, Paris 19^{ème}, France. Sep 2019 [poster]
8. Matthieu Nicault, **Cyril Bontemps**, Éric Gelhaye et Pierre Leblond. Conférence internationale Biomolécules. Palma Majorque. Oct 2019. [poster]

Présentations orales:

1. Abdur Rahman, Cyril Bontemps, Sophie Payot, Catherine Cailliez-Grimal, Anne-Marie Revol-Junelles et Frédéric Borges* Diversité de *Carnobacterium maltaromaticum* dans les produits laitiers. CBL 2013, 16-18 oct Bordeaux France
2. Aurélie Deveau*, Richard, Splivallo, Nina Kirchoff, Océane Niccolitch, Cyril Bontemps, Sanjay Antony-Babu, François Le Tacon, Pascale Frey-Klett, Annegret Kohler, Stéphane Uroz. The black truffles: more than a niche for bacteria? ACM IMC 10 aout 2014 Thailand
3. J Degois*, F. Clerc, X. Simon, C Bontemps, Pierre Leblond et Philippe Duquenne. Bioaerosol biodiversity in waste sorting plant: feasibility and uncertainty measurement European Aerosol Conference, Sep 2016, Tours, France
4. Degois Jodelle*, Clerc Frederic, Simon Xavier, Bontemps Cyril, Leblond Pierre, Duquenne Philippe : One year follow up of microbial biodiversity in a French waste sorting plant. 9th International Symposium on Modern Principles of Air Monitoring and Biomonitoring (AIRMON 2017), Dresden, 12th-15th june 2017.

5. Toussaint M., Tidjani A.R., Lorenzi J.N., Hotel L., Lespinet O., Bontemps C., Leblond P*. Micro-time scale genome evolution among natural populations of *Streptomyces* Présenté au 18 ème International Symposium on the Biology of Actinomycetes ; mai 2017 ; Jeju, Corée du sud.
6. Abdoul-Razak Tidjani*, Maxime Toussaint, Jean-Noël Lorenzi, Laurence Hotel, Olivier Lespinet, Cyril Bontemps, Pierre Leblond. Evolution génomique au sein d'une population naturelle de *Streptomyces*. Octobre 2017. Congrès Actino 2017, Lyon, France
7. Degois Jodelle*, Simon Xavier, Bontemps Cyril, Leblond Pierre, Duquenne Philippe : Generation of a fungal consortium: impact of analytics tools on biodiversity analysis. European aerosol conference 2017, Zurich, 28th august-1st september 2017.
8. Jodelle Degois*, Frédéric Clerc, Simon Xavier, Cyril Bontemps, Pierre Leblond et Philippe Duquenne. Suivi sur une année de la biodiversité microbienne dans les bioaérosols émis dans un centre de tri des déchets. Congrès français sur les aérosols 2018 (CFA), Jan 2018, Paris, France
9. Abdoul-Razak Tidjani*, Jean-Noël Lorenzi, Olivier Lespinet, Cyril Bontemps, Pierre Leblond. Massive gene fluxes in bacterial population fuels adaptation to soil forest ecosystem. Dec 2018. Functional Ecology Conference. Nancy, France
10. Caroline Choufa*, Abdoul Razak Tidjani, Michiel Vos, Cyril Bontemps, Pierre Leblond. Diversité et mobilité des éléments conjugatifs au sein d'une population de *Streptomyces* issue d'un micro-habitat rhizosphérique. 15ème congrès de la Société Française de Microbiologie, Sep 2019, Paris, France.
11. Caroline Choufa*, Anthony Gauthier, Manar Harb, Vos Michiel, Cyril Bontemps ; Pierre Leblond. Diversity and mobility of conjugative elements in a population of *Streptomyces* isolated from a rhizospheric micro-habitat. , Dec 2020 Journées des Actinobactéries 2020 - ACTINO 2020, Conférence virtuelle Gif Sur Yvette, France

Activité pédagogique

Activité pédagogique

Présentation de l'activité d'enseignement :

Mon enseignement est principalement axé sur différentes disciplines de la microbiologie, l'écologie microbienne et la biologie évolutive et vont de la première année de licence des sciences du vivant, jusqu'au master de Microbiologie. Mes enseignements se distribuent pour environ 20 % en cours magistraux (CM), 20 % en travaux dirigés (TD) et 60 % en travaux pratiques (TP).

En **biologie évolutive**, j'interviens en troisième année principalement en phylogénie et sur des notions générales d'évolution. J'ai notamment développé un nouveau TP de bio-informatique (4H) où les étudiants apprennent à construire des arbres phylogénétiques. En ce qui concerne la **microbiologie**, j'enseigne la systématique et la diversité bactérienne en première année de licence. En deuxième année, j'ai créé (habilitation 2013) et suis responsable d'une nouvelle unité d'enseignement (UE) optionnelle d'**Ecologie Microbienne** qui est choisie par près d'une centaine d'étudiants (plus d'un tiers de la promotion) depuis quelques années. Cette discipline, qui n'était pas enseignée auparavant dans ce cursus, permet aux étudiants de mieux comprendre comment la microbiologie peut se retrouver à la croisée d'autres domaines de la science (écologie, biotechnologies, santé...) et donc de mieux en appréhender ses intérêts et ses implications sociétales. En troisième année j'interviens également dans l'UE optionnelle **Interactions Bactérie-Animaux** (30-40 étudiants) où je traite du pouvoir pathogène des bactéries. Lors d'une précédente habilitation je fus également responsable (2009-2013) d'une UE de systématique et de diversité bactérienne à l'intention des L3 du parcours Biologie des organismes. En master microbiologie (et ex-Biomane), je participe à une UE **d'outils et de méthodes en Microbiologie** (précédemment en M2 Biomane, puis M1 depuis 2018) sous forme de TP. Depuis 2018, je suis responsable et participe à l'UE de bactériologie, virologie et mycologie du master de Microbiologie. Cette UE possède un volume horaire important (90H) et fait appel à la participation de plus d'une dizaine d'enseignants-chercheurs. Elle permet aux étudiants dès leur entrée en Master d'approfondir et de consolider leur socle de savoir dans toutes ces disciplines. Enfin je participe depuis 2013 à l'UE **Mise en situation expérimentale** en Master. Nous avons développé cette UE avec d'autres collègues sous forme de projets tutorés où les étudiants (3-4) choisissent une thématique que nous leur proposons. Ils doivent ensuite réaliser un compte rendu bibliographique, amener leurs propres questions scientifiques, développer une démarche scientifique pour y répondre, réaliser leurs expériences en séance de TP, exposer leurs résultats à l'écrit et à l'oral et également auto-analyser leur travail. Mon rôle consiste à accompagner les étudiants (trois projets différents par an) dans la construction et la validation de leur projet depuis le départ sous forme de réunions, puis pratiquement. Ce type de pédagogie active et participative est généralement très enrichissante pour les étudiants et leur permet de développer une plus grande autonomie et d'élargir leur champ de réflexion.

J'ai créé et développé la plupart des cours, TD et TP que je donne actuellement et les actualise d'années en années. Pour les cours dont j'ai pu hériter, notamment en début de carrière, j'ai toujours créé mes propres supports et adapté les contenus avec la même intention de faire évoluer mon enseignement. J'essaye également de faire évoluer mes pratiques pédagogiques (projets tutorés).

Encadrement et évaluation de stagiaires

Depuis mon recrutement j'ai encadré 14 stagiaires. Cinq de niveau L3, sept M1 et deux M2. Je pense que cet enseignement par et pour la recherche est très enrichissant pour les étudiants, mais également pour l'encadrant. J'essaye toujours de faire en sorte que le travail de l'étudiant soit au maximum valorisé quand cela est possible et les travaux de mes deux étudiants de M2 (Pierre-Vincent Revol, Maxime Toussaint) et d'une étudiante de M1 (Mathilde Jeanbille) ont été valorisés dans des publications.

Je participe également tous les ans à l'évaluation de rapports de M1 et M2 et suis régulièrement membre du jury d'évaluation de M1. Depuis 2013 je suis également membre du jury d'évaluation des stages de L3 (2 jours) où les étudiants (environ 80 par an) présentent un rapport de stage sous forme de poster.

Responsabilités pédagogiques et formations

Responsable de 2 UE (L2 et M1).

Enseignant référent en L1 : J'accompagne au cours de leur première année un groupe d'étudiant afin de les diriger dans leur orientation et leurs méthodes de travail. En dehors de plusieurs réunions annuelles prévues avec l'ensemble du groupe, je joue également le rôle d'intermédiaire avec certains étudiants et l'administration lors de problèmes (orientation, échec aux examens...).

Membre des jurys de sélection des ATER pour l'Université de Lorraine 2012.

Présidence des jurys du baccalauréat général de Nouvelle Calédonie, session de 2009

Formation ACT – Encadrement doctoral effectuée les 19 et 20 décembre 2017 à Nancy. Cette formation m'a permis de mieux appréhender le rôle de directeur de thèse et notamment d'essayer d'améliorer l'interaction avec les doctorants ou autres stagiaires comme par exemple en faisant des réunions plus régulières sur l'avancement de leurs travaux.

Synthèse des activités de recherche

Synthèse des activités de recherche

Mes activités de recherche ont visé au cours de ma carrière i) à explorer la diversité bactérienne de différents environnements, ii) exploiter cette diversité à des fins appliquées et iii) appréhender l'écologie et l'évolution des bactéries dans leur niche.

Mon cursus universitaire a débuté en biologie cellulaire et physiologie à l'Université Henri Poincaré de Nancy (1995-2000) et s'est poursuivi par un DEA (2000-2001) et un doctorat (2001-2005) en Ecologie Microbienne à l'Université Claude Bernard de Lyon. Dans le cadre du DEA et de la thèse, mes travaux de recherche ont été dirigés par Catherine Boivin-Masson successivement au laboratoire des symbioses tropicales et méditerranéennes (LSTM) de Montpellier (2000-2002), puis au laboratoire des interactions plantes Microorganismes (LIPM) de Toulouse (2002-2005). Au cours de ces premiers travaux, j'ai commencé à explorer la diversité de bactéries symbiotiques de plantes (rhizobia) notamment par le développement de nouveaux outils moléculaires, mais également à initier l'exploration de la diversité des β -rhizobia, un groupe de ces symbiotes nouvellement découverts à l'époque. J'ai ensuite poursuivi ce dernier axe de recherche lors de mon premier post-doc à l'Université de York (GB) sous la direction de Peter Young (2006-2008), notamment en prospectant la diversité des β -rhizobia chez les plantes du genre *Mimosa*. De 2008 à 2009 j'ai ensuite commencé, toujours à l'Université de York, mais au laboratoire CNAP dirigé par Neil Bruce, un nouveau post doc visant à décrire et à caractériser la diversité de bactéries dégradant des explosifs. Enfin en 2009, j'ai été recruté en tant qu'enseignant chercheur au laboratoire Dynamic de l'UMR 1128 INRA/Université de Lorraine dirigé à l'époque par le Pr. Pierre Leblond. Au sein de l'équipe StrAda (*Streptomyces* Adaptation) dirigée par Pierre Leblond, nous avons construit et développé ensemble un projet (4 thèses co-encadrées) visant à étudier l'écologie, l'évolution et la génétique des bactéries du genre *Streptomyces*.

Ce document, destiné à l'obtention du diplôme d'Habilitation à Diriger des Recherches, synthétise mes activités scientifiques depuis mon doctorat jusqu'à mes projets de recherche actuels en tant que MCU dans le laboratoire Dynamic de l'Université de Lorraine. Je développerai ensuite le projet de recherche que je compte réaliser au cours des années suivantes.

1. Doctorat : Exploration de la diversité des rhizobia : nouveaux outils et concepts

J'ai débuté mon doctorat au LSTM et, suite à une mobilité de ma directrice de thèse, l'ai continué au Laboratoire des Interactions Plantes-Microorganismes de Toulouse. Les thématiques développées au LIPM de Toulouse sont principalement liées aux interactions entre les plantes et les micro-organismes symbiotiques ou pathogènes, par des études concertées des partenaires microbiens et végétaux.

1.1 Thématique et problématiques de la thèse

Les légumineuses avec 18 000 espèces constituent une des familles de plantes les plus répandues sur Terre. Ces plantes pionnières sont capables de croître dans des sols pauvres en fixant l'azote atmosphérique grâce à une symbiose avec des bactéries du sol, les rhizobia. La description de nombreuses et nouvelles espèces de rhizobia, souvent plus éloignées entre elles que de bactéries non-symbiotiques a conduit à utiliser le terme rhizobia comme un terme fonctionnel. On considère dorénavant un rhizobia comme étant une bactérie capable d'établir une symbiose fixatrice d'azote avec les légumineuses en dehors de toute considération taxonomique. Cette symbiose se traduit par un

dialogue moléculaire entre la plante et la bactérie, qui *in fine* aboutit à la formation d'une structure particulière chez la plante appelée nodule. Les nodules sont ensuite colonisés par les bactéries où elles vont exprimer une enzyme clef absente du règne eucaryote : la nitrogénase, qui va permettre la fixation de l'azote atmosphérique. Une fois modifié, cet azote est redistribué à la plante qui peut l'utiliser pour sa propre croissance. En échange, les rhizobia disposent d'une nouvelle niche écologique et reçoivent des composés carbonés issus de la photosynthèse. Cette symbiose permet à la plante de croître dans des sols pauvres en azote et a participé au succès écologique des légumineuses.

Les rhizobia possèdent des gènes symbiotiques caractéristiques qui n'ont jamais été décrits chez des non-symbiotiques. Ces gènes sont appelés gènes *nod* pour nodulation et sont impliqués dans l'initiation de la formation du nodule. Le rôle important des transferts horizontaux de ces gènes *nod* est reconnu comme une force majeure de l'évolution des rhizobia et a contribué à leur origine polyphylétique. L'exemple le plus frappant de l'implication de tels transferts a été l'identification en 2001 de gènes *nod* chez des bactéries des genres *Burkholderia* et *Cupriavidus* (Moulin et al., 2001). Ces bactéries appartiennent à la sous-classe β des protéobactéries. Elles étaient donc taxonomiquement très éloignées des rhizobia décrits auparavant et uniquement présents au sein de la sous-classe α des protéobactéries. Malgré l'origine polyphylétique connue des rhizobia, l'identification inattendue de ces nouveaux symbiontes a radicalement changé la perception taxonomique que l'on pouvait en avoir et ouvrait de nouvelles perspectives de recherche sur la biodiversité, l'origine et l'évolution des rhizobia. Les termes α - et β -rhizobia sont depuis utilisés pour rendre compte de cette distance taxonomique.

1.2 Caractérisation des premiers β -rhizobia

Consécutivement à la découverte des β -protéobactéries nodulantes, il apparaissait indispensable de mieux les caractériser, afin de faire émerger un nouveau modèle de rhizobium, ce qui a constitué le premier objectif de ma thèse. Ainsi, au niveau physiologique, j'ai étudié leur capacité de nodulation, de fixation d'azote et ai développé des outils moléculaires pour permettre leur manipulation au laboratoire. Au niveau génomique, j'ai pu démontrer que les espèces types de β -rhizobia disponibles alors possédaient toutes un plasmide de 500 kb portant les gènes canoniques de la symbiose (Chen et al., 2003; Amadou et al., 2008) (Figure 1). Ces plasmides étaient absents chez les souches non symbiotiques des mêmes espèces, suggérant l'émergence de la symbiose chez ces souches par transfert conjugatif.

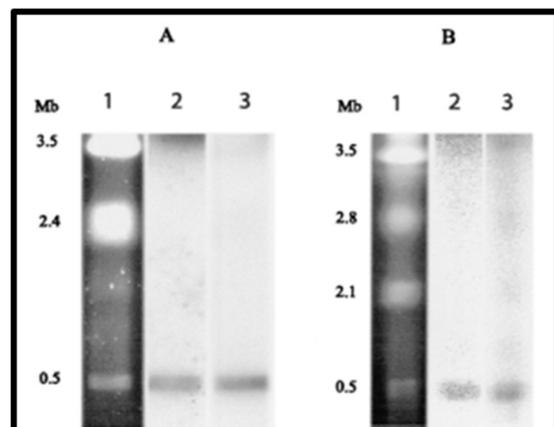


Figure. 1 : Localisation des gènes symbiotiques *nodA* et *nifH* des β -rhizobia *Cupriavidus taiwanensis* (A) et *Burkholderia phymatum* (B). Les puits 1 correspondent à un gel PFGE montrant les différents réplicons du génome des bactéries. La taille des réplicons est indiquée sur la gauche. Les puits 2 et 3 correspondent respectivement à des hybridations en Southern blot réalisées avec des sondes *nodA* et *nifH*.

1.3 Développement d'une puce ADN pour la détection et la caractérisation symbiotique des rhizobia

Le deuxième objectif de ma thèse a été de développer une approche moléculaire par hybridation sur puce à ADN permettant l'identification et la caractérisation des rhizobia. L'utilisation des puces à ADN en écologie microbienne, notamment pour détecter la présence de gènes dans des échantillons environnementaux était marginale et essentiellement consacrée à l'identification par hybridation spécifique sonde-cible de gènes taxonomiques ou fonctionnels de séquences connues (Boivin-Masson et al., 2006). Le criblage environnemental de bactéries pour la présence de gènes d'intérêt de séquences inconnues et variables constituait donc un challenge. Pour aborder ce problème, nous avons réalisé une puce prototype basée sur le gène *nodC* spécifique des rhizobia en développant une approche reposant i) sur un design original des sondes ciblant des régions conservées de ce gène, permettant de détecter des variants encore inconnus (Figure 2) et ii) des conditions d'hybridation peu stringentes permettant une hybridation de chaque gène cible sur plusieurs sondes. Ainsi, au lieu d'obtenir une seule hybridation du gène d'intérêt sur une sonde unique, chaque gène générerait un pattern d'hybridation sur plusieurs sondes (Figure 3). La détection du gène *nodC* pour des bactéries dont la séquence n'était pas représentée sur la puce a donc été possible. Chaque pattern d'hybridation s'étant révélé caractéristique de la séquence hybridée, une analyse par clustering hiérarchisé a permis de reconnaître des gènes identiques, mais aussi de voir la proximité d'un gène inconnu par rapport à des gènes de référence et d'apporter une information phylogénétique (Bontemps et al., 2005). Cette détection a été réalisée à partir d'ADN génomique de cultures pures, mais aussi à partir d'ADN directement extrait de nodules. La sensibilité de cette approche a donc permis pour la première fois une caractérisation de rhizobia à partir de nodule et de s'affranchir des étapes de mise en culture.

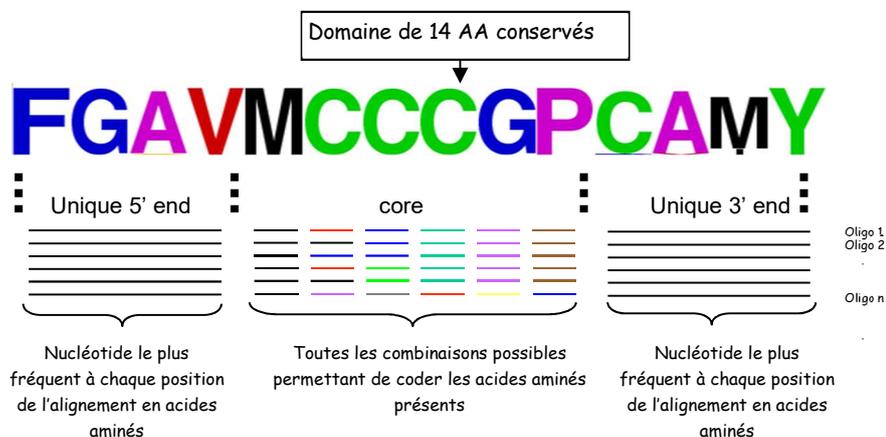


Figure 2 : La stratégie CODHEMOP : Dessin de sondes potentielles d'un domaine protéique conservé de NodC. La technique de définition des sondes CODHEMOP cible les zones protéiques conservées du gène d'intérêt. La partie centrale de la sonde est une dérivation de toutes les séquences nucléotidiques possibles permettant de coder les acides aminés centraux de la zone protéique concernée. Afin de conserver un nombre raisonnable de sondes et une longueur suffisante pour l'hybridation, des queues 3' et 5' sont ensuite ajoutées de part et d'autre de cette zone centrale. Ces séquences correspondent, elles, aux séquences nucléotidiques les plus fréquemment rencontrées dans l'ensemble des séquences connues.

L'application de la stratégie puce développée ici à d'autres modèles présente un énorme potentiel pour détecter des gènes d'intérêts (biodégradation, fixation d'azote, production de molécules, pathogénicité, résistance aux antibiotiques etc...) présents chez des bactéries taxonomiquement diverses vivant dans des environnements variés. Dans la mesure où ces gènes ne confèrent pas obligatoirement de phénotypes décelables et où de nombreuses bactéries ne sont pas cultivables, cette stratégie par puces à ADN apparaissait particulièrement prometteuse pour leur détection dans des échantillons biologiques.

Les travaux réalisés au cours de ma thèse ont abouti à 3 publications dont une en premier auteur.

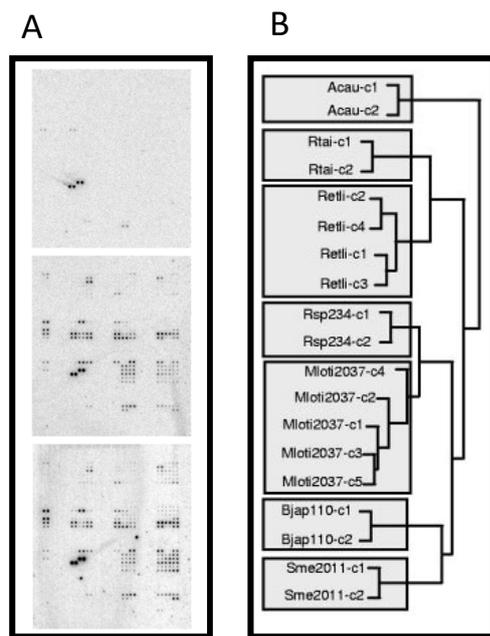


Figure 3 : Exemple d'hybridation et analyse des puces à ADN *nodC*. **A)** Patterns d'hybridation sur puces à ADN *nodC* utilisant la technique CODHEMOP. En haut puce à ADN hybridée avec l'ADN d'une souche ne présentant pas le gène *nodC*. Seuls les témoins internes positifs présentent un signal d'hybridation significatif. Au centre, hybridation de l'ADN génomique de *Bradyrhizobium japonicum*. Les conditions de faible stringence d'hybridation, ont permis l'hybridation différentielle de chaque gène cible sur un grand nombre de sondes générant un pattern d'hybridation spécifique. En bas, hybridation à partir de l'ADN extrait d'un nodule infecté par *B. japonicum*. Cette hybridation conduit à un pattern identique à celui obtenu avec de l'ADN génomique de la même souche. **B)** Typage par puce à ADN de sept rhizobia de référence en utilisant le clustering hiérarchique. Le dendrogramme permet le regroupement et la reconnaissance des différentes hybridations réalisées avec l'ADN d'une même souche. Les différentes répétitions biologiques d'une même souche sont notées de c1 à c5. D'après Bontemps et al. 2005

2. Stage post-doctoral : In search of β -rhizobia.

J'ai effectué mon premier post-doc au sein de l'équipe du Pr. Peter Young à l'Université de York en Angleterre. Cette équipe s'intéresse à l'écologie microbienne et à l'évolution des interactions unissant les plantes avec les rhizobia et les champignons mycorhiziens.

2.1 Thématique et problématiques

Suite aux travaux conjoints de plusieurs équipes, dont ceux entrepris au cours de mon doctorat, la caractérisation des β -protéobactéries nodulantes (β -rhizobia) avait grandement progressé (Chen et al., 2003). On savait notamment que les β -rhizobia possédaient des gènes et une stratégie symbiotique identiques à celle des α -rhizobia, qu'ils étaient répandus sur plusieurs continents et n'étaient pas des symbiontes opportunistes. De plus, malgré un nombre de souches restreint, trois nouvelles espèces de *Burkholderia* et une nouvelle espèce de *Cupriavidus* étaient décrites. Si la présence de gènes *nod* similaires suggérait l'acquisition des fonctions de nodulation par transfert horizontal chez les β -rhizobia (Moulin et al., 2001), peu de choses étaient connues sur l'évolution de cette nouvelle classe de symbiontes. Le nombre restreint de souches constituait l'un des facteurs limitants à une étude évolutive

plus approfondie et la constitution d'une collection plus importante de souches apparaissait primordiale pour répondre à ces questions.

Plusieurs études de terrain et en laboratoire avaient suggéré l'association préférentielle de certaines plantes du genre *Mimosa* avec les β -rhizobia (Chen et al., 2003). Avec environ 500 espèces, les *Mimosa* possèdent deux centres de diversification : le Brésil et le Mexique avec environ 350 et 100 espèces respectivement. Deux campagnes d'échantillonnage de ces plantes ont été réalisées. Une première en 2005 au Brésil avec 143 bactéries isolées de nodules de 47 espèces de *Mimosa* différentes et la seconde en 2007, à laquelle j'ai participé, au Mexique avec 87 souches isolées des nodules d'une vingtaine d'espèces différentes. Mes travaux ont en premier lieu porté sur la caractérisation taxonomique de ces souches par des approches de phylogénie moléculaire et ont montré des associations différentes de symbiotes entre le Brésil et le Mexique. Au Brésil, 98 % des symbiotes de *Mimosa* brésiliens étaient des β -rhizobia appartenant au genre *Burkholderia* (Bontemps et al., 2010a). Plusieurs nouvelles espèces ont pu être décrites suite à ces travaux (Chen et al., 2008; Sheu et al., 2012, 2013). En revanche, les *Mimosa* mexicains, notamment endémiques, étaient quant à eux préférentiellement associés à des alphaprotéobactéries des genres *Ensifer* et *Rhizobium*, les rares *Burkholderia* trouvés étant associés à des *Mimosa* possédant des distributions géographiques larges sur le continent sud-américain (Bontemps et al., 2016). Des corrélations avec le caractère endémique des plantes, leur distribution géographique et le type de sol (pH) ont pu être mises en évidence, permettant de proposer un scénario évolutif dans lequel lorsque les principales lignées mexicaines et brésiliennes de *Mimosa* se sont séparées, notamment après une séparation transitoire des continents nord- et sud-américains, leurs descendants ont co-évolué avec la microflore locale

Concernant les β -rhizobia, l'analyse phylogénétique comparée de marqueurs taxonomiques et symbiotiques a montré que les *Burkholderia* symbiotiques étaient plus proches d'espèces saprophytes et diazotrophes (fixatrices d'azote) que d'espèces phytopathogènes. L'analyse des gènes *nifH* impliqués dans la synthèse de la nitrogénase a permis de montrer que le caractère diazotrophe était ancestral au niveau du genre *Burkholderia*. Concernant la symbiose et les gènes de nodulation, les *Burkholderia* forment un groupe monophylétique suggérant une origine unique à la symbiose. La comparaison des gènes symbiotiques et de ménage suggérait un taux de recombinaison des gènes *nod* peu fréquent chez les *Burkholderia* et une évolution conjointe avec le fond génomique global des bactéries, indiquant que les *Burkholderia* avaient acquis leurs gènes symbiotiques de longue date et certainement avant la différenciation de certaines espèces. Les gènes auraient donc pu se transmettre de façon verticale et suggère que, de façon inattendue, les *Burkholderia* étaient des rhizobia « anciens » et répandus malgré leur découverte relativement tardive (Bontemps et al., 2010b) (figure 4).

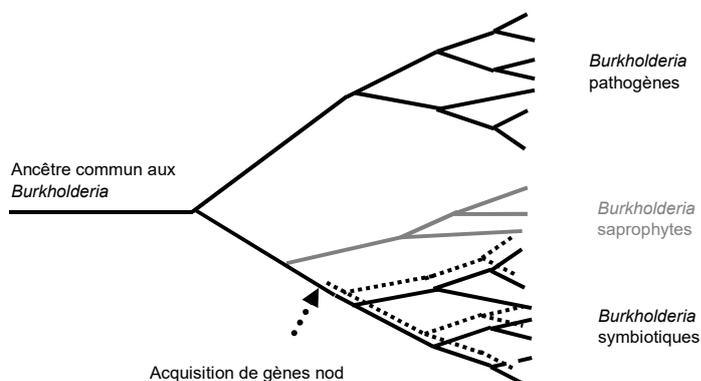


Figure 4 : Schéma de l'évolution potentielle des capacités symbiotiques au sein des *Burkholderia*. Les lignes pleines représentent la phylogénie des gènes de ménage et les lignes en pointillé l'évolution des gènes de nodulation. La congruence des phylogénies des gènes de symbiose et de ménage suggère une acquisition ancienne et unique des gènes de symbiose chez les *Burkholderia* symbiotiques de *Mimosa* au Brésil

2.2 Projets parallèles : Etude de la diversité symbiotique de légumineuses chinoises

Au cours de ce post-doc j'ai eu l'occasion de collaborer avec le Dr. Gehong Wei de l'Université de Xinjiang en Chine, de superviser un de ses doctorants durant plusieurs mois et de co-diriger un projet de recherche visant à étudier la diversité symbiotique de légumineuses chinoises. Un premier projet a porté sur l'étude phylogénétique des symbiontes de la légumineuse *Alhagi sparsifolia* adaptée aux sols arides afin de développer de nouveaux inocula adaptés aux régions désertiques. Notre étude a permis i) de décrire trois nouvelles espèces potentielles de *Mesorhizobium* dont deux forment un clade distinct des autres espèces de ce genre (Chen et al., 2010, 2011) et ii) de mettre en évidence des transferts de gènes symbiotiques entre ces espèces pour pouvoir s'adapter à leur hôte (Wei et al., 2009a)).

Un second projet a porté sur la légumineuse *Robinia pseudoacacia*. En comparant la diversité associée à cette plante invasive dans des régions nouvellement colonisées et dans sa région native, ce projet a permis de souligner l'importance des transferts de gènes symbiotiques entre différentes espèces et genres bactériens pour la colonisation par certaines plantes invasives de nouveaux environnements (Wei et al., 2009b).

Les travaux réalisés au cours de ce post doc ont abouti à 2 publications en premier auteur, 2 en dernier et 9 en co-auteur.

3. Stage post doctoral: The molecular biology of nitroamine degradation in soils

J'ai effectué ce Post-Doc dans le laboratoire du Pr. Neil Bruce à l'Université de York (Angleterre). Ce laboratoire s'intéresse tout particulièrement à la découverte de nouvelles enzymes impliquées dans la biorémédiation de composés toxiques. Il a contribué à l'élucidation de diverses voies métaboliques, à l'analyse structurale des différentes enzymes impliquées et à leur bioingénierie dans des systèmes transgéniques.

Mon projet visait à caractériser la diversité de bactéries capables de dégrader les explosifs. Si les explosifs ont un effet délétère bien connu au moment de leur utilisation, ils constituent également une source de pollution importante des sols par la suite. Le lessivage de l'explosif RDX (Royal Demolition eXplosive) dans les nappes phréatiques est notamment une source majeure de contamination des eaux aux Etats-Unis. Des études précédentes ont démontré que la présence du gène *xpIA*, un nouveau cytochrome unique chez les bactéries permettait à certaines bactéries de dégrader le RDX et de l'utiliser comme seule source azotée (Rylott et al., 2011). L'un des premiers objectifs de ce projet a été de déterminer l'évolution et l'origine de *xpIA*. En prospectant la diversité de bactéries dans des sols pollués et par des techniques d'enrichissements sélectifs, j'ai pu isoler de nombreuses souches du genre *Rhodococcus* capables de dégrader le RDX. Tous ces isolats possédaient *xpIA* et la phylogénie de ce gène, comparée à celles des gènes de ménages, suggérait de nombreux transferts horizontaux de gènes entre différentes espèces bactériennes, potentiellement par le transfert d'îlots génomiques ou de mégaplasmides. Les gènes flanquant *xpIA* étant conservés entre les différentes souches, j'ai également initié l'étude de ce cluster de gènes conservés contenant *xpIA* et notamment un régulateur transcriptionnel et une perméase. Suite à mon recrutement au bout d'un an, je n'ai pas poursuivi ces travaux, qui ont pu être valorisés dans une publication (Chong et al., 2014).

4. Activités de recherche en tant que Maître de conférences

Le laboratoire DynAMic (Dynamique des génomes et Adaptation Microbienne) est une unité mixte de recherche entre l'INRAE et l'Université de Lorraine (UMR1128). La thématique de recherche de l'unité concerne les mécanismes d'évolution rapide chez les bactéries notamment via le transfert horizontal de gènes. L'étude de ce phénomène inclut la caractérisation des mécanismes moléculaires du transfert de l'information génétique et de son intégration dans le génome hôte et des mécanismes de régulation de ces processus ainsi que l'étude de l'impact des séquences transférées chez la bactérie hôte (diversité du génome, nouvelles fonctions, adaptation). L'unité étudie deux groupes bactériens et leur écosystème respectif : les streptomycètes et le sol forestier (équipe StrAda) et les streptocoques chez leur hôte (équipe ICE-TeA).

Mon recrutement s'est fait dans l'équipe StrAda (*Streptomyces* Adaptation), dirigée par Pierre Leblond et alors directeur du laboratoire. Si cela a constitué une rupture par rapport aux organismes modèles étudiés dans mes précédents projets, il y avait une forte cohérence dans le type d'approches utilisées (génétique, génomique, biologie moléculaire...) et dans les thèmes développés, comme l'évolution des bactéries et le transfert de gènes. Je suis devenu depuis janvier 2022 responsable de cette équipe à la suite de Pierre Leblond.

UMR INRAE-UL 1128 Dynamique des Génomes et Adaptation Microbienne

Bertrand Aigle DU (Pr), Sophie Payot-Lacroix DUA (DR), Layla Rateau
RA (T)



Equipe ICE-TeA, ICE Transfert & Adaptation

Responsable : Nathalie Leblond-Bourget, Pr

Florence Charron-Bourgoin*, MC
Badreddine Douzi, CRCN INRAE
Gérard Guédon, MC HDR
Virginie Libante, MC
Sophie Payot-Lacroix, DR INRAE, HDR
Yvonne Roussel, MC
Nicolas Soler, MC

Haifa Laroussi, doctorante/Demi ATER
Manon Dechene-Tempier, doctorante INRAE-ANSES
Robine Maffo Woulefack

Johan Staub, T INRAE
Stéphane Bertin, T UL
Louise Thiriet, AI INRAE, CDD Feder

Equipe StrAda, Streptomyces Adaptation

Responsable : Cyril Bontemps, MC

Bertrand Aigle, Pr
Claire Bertrand, MC
Pierre Leblond, Pr
Annabelle Thibessard, MC

Caroline Choufa, doctorante Labex -
Région/Demi ATER
Oyut Dagva, doctorante, CD

Anthony Gauthier, T INRAE
Laurence Hôtel, T UL
Emilie Piotrowski, T UL

Organigramme de l'Unité au 01/01/2022

4.1 Exploration de la diversité des *Streptomyces* dans l'écosystème forestier

4.1.1 Les *Streptomyces*

Les *Streptomyces* sont des bactéries filamenteuses de l'ordre des actinomycètes. Leur croissance se fait sous forme d'un mycélium végétatif permettant de prospecter leur environnement et leur reproduction se fait par sporulation. Quand les conditions de vie sont favorables, une spore va germer et se développer en hyphes ramifiés qui vont s'accroître par leur extrémité. Cette croissance est souvent associée à la production d'exo-enzymes permettant de dégrader des polymères comme la cellulose ou la chitine ((Barka et al., 2016); figure 5). Quand les conditions de croissance deviennent moins favorables, comme par exemple lors d'une réduction en nutriments, le programme de sporulation va être initié. Ce dernier, souvent associé à une production importante de métabolites spécialisés (MS), va permettre la différenciation du mycélium végétatif en mycélium aérien qui se subdivisera ensuite en chaînette de spores dont chacune contiendra un seul chromosome (van Bergeijk et al., 2020).

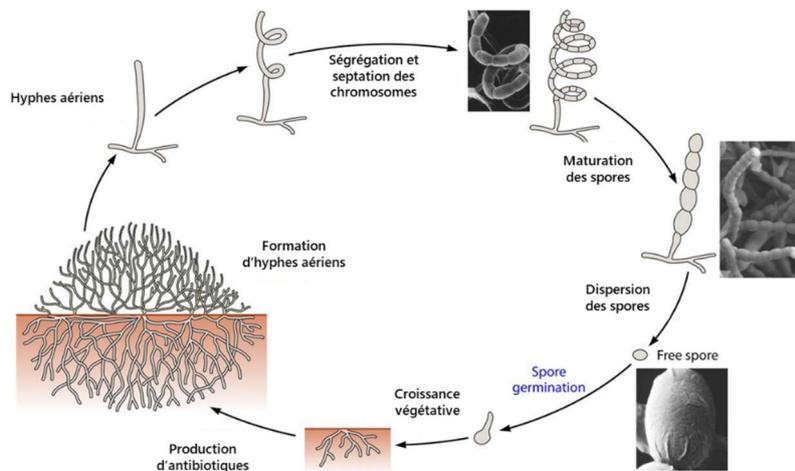


Figure 5 : Représentation schématique du cycle de vie des *Streptomyces*.
Adapté de Barka et al. 2016

Les *Streptomyces* sont ubiquistes dans les sols, les océans et l'eau douce. En marge de ces états libres et saprophytes, elles sont de plus en plus retrouvées en interaction avec des eucaryotes comme des insectes, des éponges, des champignons ou des plantes (van der Meij et al., 2017). Cette versatilité dans l'occupation de niches écologiques variées et leur succès indéniable d'adaptation est en partie imputable à leur capacité à produire des métabolites spécialisés (antibiotiques, enzymes...). Il est également concevable que cette grande diversité chimique soit, elle-même, la résultante des interactions des *Streptomyces* avec les organismes partageant leur niche écologique. C'est souvent par le prisme de la production de MS que sont connues et étudiées les *Streptomyces*. Le détournement de cet arsenal métabolique constitue en effet une source importante de biomolécules d'intérêt médical et industriel. La moitié des antibiotiques utilisés en médecine humaine et vétérinaire proviennent ainsi des *Streptomyces* (Labeda et al., 2017) et elles furent à l'origine de la révolution médicale qu'a constituée la découverte des antibiotiques après les années 1940. De nombreuses enzymes utilisées en industrie trouvent également leur source chez les *Streptomyces*.

Une autre originalité des *Streptomyces* réside dans leur organisation génomique. Ce sont parmi les rares bactéries avec *Borrelia* (Casjens and Huang, 1993), *Agrobacterium* (Wood et al., 2001) et *Rhodococcus* (McLeod et al., 2006) à posséder des chromosomes linéaires, complétés parfois par des plasmides circulaires ou également linéaires. La réplication du chromosome est initiée à l'*oriC* située en position plus ou moins centrale et se continue simultanément jusqu'aux extrémités constituées de séquences

répétées inversées (TIR pour Terminal Inverted Repeats) (Chang and Cohen, 1994) qui peuvent être variables en taille (de quelques nucléotides à plus d'un mégabase (Yang et al., 2015). A l'extrémité des TIR se trouvent des télomères dont un système archétype a été défini par Kirby & Chen (2011) sur la base des séquences télomériques de *S. coelicolor* et *S. avermitilis*. Il consiste en une séquence de 160 nucléotides possédant plusieurs palindromes formant des structures tige-boucle donnant selon les cas au télomère une forme de trèfle ou d'oreille de lapin. Parmi ces structures secondaires, un motif palindromique de 13 nucléotides est particulièrement bien conservé et possède un motif de 3 nt 5'-GCA-3' en son centre, permettant de créer une boucle conférant une résistance à l'activité nucléosidique simple brin de la cellule (Kirby, K and Chen, C.W., 2001). Toutefois, des télomères atypiques ont été décrits chez des plasmides linéaires ou le chromosome de *S. griseus* et consistent en des séquences hétérogènes en taille et avec des motifs boucles différents (Goshi et al., 2002). Par rapport à un chromosome circulaire, un chromosome linéaire implique un problème de fin de réplication où la fin du brin 3' parental ne peut être répliquée à cause de l'échec de l'amorçage sur le brin complémentaire. Ce problème est levé chez les *Streptomyces* grâce à un complexe de protéines chaperonnes appelé TP-TAP qui se fixe sur les télomères et permet d'amorcer la réplication de l'ADN à partir de l'extrémité 3' et de boucher le gap de réplication (Yang et al., 2017). Si les télomères archétypes sont associés à un système TP/TAP lui-même caractérisé d'archétype, les télomères atypiques sont associés à des systèmes TP/TAP originaux pouvant présenter des homologies avec les TP/TAP archétypes ou être complètement différents comme le système GtpB/GtpA de *S. griseus* (Suzuki et al., 2008).

4.1.2 Diversité taxonomique et fonctionnelle des *Streptomyces* à l'échelle de l'écosystème forêt

La forêt représente un biome important qui recouvre près d'un tiers des terres émergées (Martínez et al., 2005). Pour son bon fonctionnement, le bois mort, source importante de carbone, doit y être dégradé et recyclé pour assurer l'homéostasie du système (Rinne-Garmston et al., 2019). Cette dégradation est réalisée par des cohortes de microorganismes composées de champignons lignivores (Lustenhouer et al., 2020), mais aussi de nombreuses bactéries cellulolytiques dont font partie les *Streptomyces*. Afin de mieux comprendre le rôle des *Streptomyces* dans ces écosystèmes, nous avons entrepris lors d'une première étude la création d'une collection de 79 *Streptomyces*. L'échantillonnage a été effectué à différents points de la hêtraie du Montiers en prélevant des quantités de sol de l'ordre du gramme et distants de plusieurs dizaines, voire centaines de mètres sur le site SOERE-OPE (Système d'Observation et d'Expérimentation au long terme pour la Recherche en Environnement) qui mesure régulièrement les constantes physico-chimiques du sol de cette forêt. La caractérisation de cette collection a permis de voir que nos souches, bien qu'appartenant à des espèces différentes, possédaient en majorité des capacités cellulolytiques, étaient capables d'inhiber et/ou de promouvoir la croissance de champignons forestiers et pouvaient s'inhiber entre elles, faisant des *Streptomyces* des acteurs bactériens importants des sols forestiers. Cette première étude a été réalisée en collaboration avec Marie-Pierre Turpault (INRA BEF) et Stéphane Uroz (INRA-IaM) et publiée dans FEMS Microbiology Letter (Bontemps et al., 2013).

4.1.3. Etude de la diversité des *Streptomyces* à l'échelle d'une population

Création d'une collection de souches appartenant à une même population

Contrairement aux études concernant l'écologie des animaux et des plantes, le cadre de la population est rarement pris en compte lors de l'étude des bactéries du sol. C'est pourquoi, suite à notre première collection qui décrivait une diversité à l'échelle de l'écosystème, nous nous sommes posés la question de savoir quelle pouvait être le niveau de diversité d'une population de *Streptomyces*. La notion de population étant au cœur de mon futur projet, je la développerai plus dans cette partie (partie 3.1). Toutefois, afin de clarifier la création de notre collection, on peut définir une population comme les individus d'une même espèce vivant dans un même environnement. C'est pourquoi, afin de lever toute ambiguïté dans la création de notre collection, nous avons échantillonné de façon restrictive, que ce soit au niveau spatial et taxonomique. Borner un environnement bactérien étant ardu, *a fortiori* avec des bactéries sporulantes dont la dispersion est difficile à estimer, nous avons prélevé des grains de sol de l'ordre du mm³ sur la rhizosphère d'un jeune hêtre ou à sa proximité (de l'ordre du cm), potentiellement en dehors de sa zone d'influence. Quarante-neuf souches sporulantes et isolées de 8 grains de sol ont été mises en collection. Pour nous assurer de travailler avec des souches à un niveau intra-spécifique, nous avons ensuite sélectionné des souches avec des gènes ARNr 16S identiques et des profils MLST très proches (quelques mismatches sur 5 gènes représentant au total plus de 3000 positions). Trente-cinq souches correspondant à ces critères constituent l'ensemble de notre collection. Au cours de la thèse de AR Tidjani, nous avons séquencé le génome de 11 de ces souches co-spécifiques (Tidjani et al., 2019a). Les tailles de ces génomes allaient de 11.75 à 12.44 Mb avec la présence ou non de plasmides, les positionnant parmi les plus gros génomes bactériens séquencés. La proximité taxonomique de nos souches au niveau de l'espèce a pu également être confirmée ultérieurement grâce à des analyse d'ANI (Average Nucleotidic diversity) avec des pourcentages allant de 98.68 à 99.99%. Cette faible divergence nucléotidique renforçait l'idée que cette population dérivait d'un ancêtre commun récent.

Un flux massif de gènes est à l'origine de la diversité des populations de *Streptomyces*.

Une étude de génomique comparative a mis en évidence que nos souches différaient les unes des autres en termes de présence/absence de gènes (de 12 à plusieurs milliers de gènes) (Tidjani et al., 2019b). Au niveau des 11 souches, environ un tiers des gènes identifiés (n=5 036) formaient le génome accessoire de notre population, c'est-à-dire des gènes qui n'étaient pas présents dans l'ensemble des souches. Un quart de ces gènes variables étaient présents sur des éléments extra-chromosomiques et le reste distribué sous forme d'indels (insertion/délétion) chromosomiques allant de quelques gènes à plusieurs centaines. Dans les cas les plus extrêmes les souches les plus proches ne différaient que d'un indel et les plus éloignées de 124. La comparaison deux à deux de l'ensemble des 11 souches a permis d'estimer qu'un minimum de 452 événements indépendants ont été nécessaires pour générer cette diversité, impliquant des transferts de gènes. Si le transfert de gènes est une force importante de l'évolution des bactéries, l'originalité de notre résultat résidait dans sa mise en évidence au sein de bactéries isolées de micro-habitats du sol et séparées par un temps évolutif court, impliquant un flux massif de gènes au cours de la diversification de la population de *Streptomyces*.

La diversité génomique n'est pas distribuée de manière homogène chez les *Streptomyces*

Par essence, notre collection permet de visualiser des événements évolutifs récents qui impactent des souches proches. Lorsque nous nous sommes intéressés à leur localisation sur le chromosome, nous

avons pu mettre en évidence que les indels différenciant nos souches n'étaient pas distribués de manière homogène, mais étaient plus représentés dans les bras du chromosome que dans les régions centrales et présentaient un gradient augmentant jusqu'aux extrémités (Tidjani et al. 2019a et figure 6).

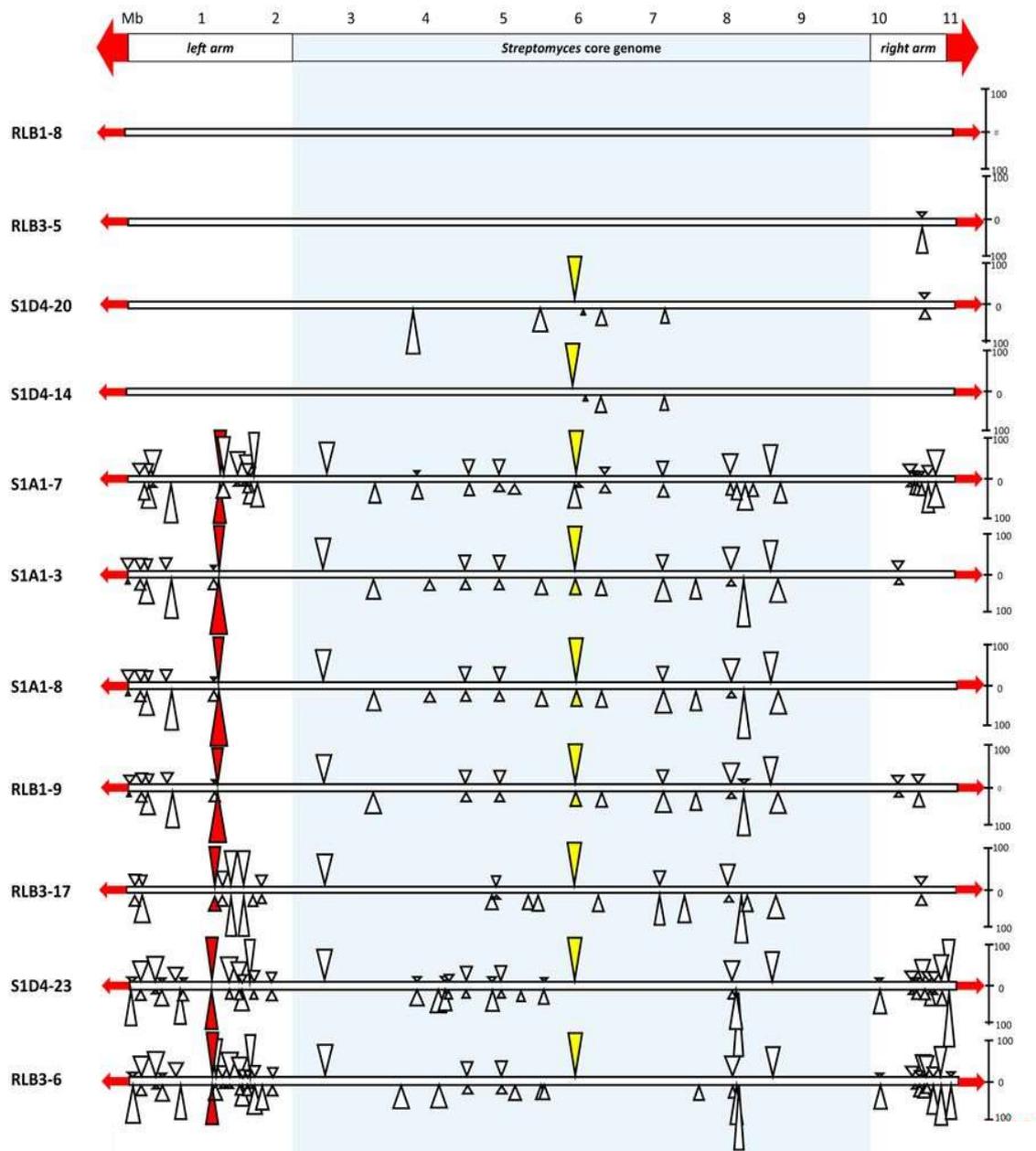


Figure 6 : Distribution des événements d'insertion et de délétion le long du chromosome linéaire de *Streptomyces*. Le schéma du haut représente le chromosome de *Streptomyces* avec une échelle en mégabases. La position du génome central du genre *Streptomyces* est mise en évidence par un cadre gris clair. Les répétitions inversées terminales (TIR) sont représentées par des flèches rouges. La partie inférieure montre des illustrations de comparaisons de génomes par paires (parmi les 10 paires possibles) au sein de la population en utilisant la souche RLB1-8 comme référence. Les rectangles représentent le chromosome linéaire de chaque souche. Les souches sont ordonnées de haut en bas par rapport à leur distance phylogénétique avec la référence. Les triangles au-dessus du chromosome représentent les insertions dans la souche de référence, tandis que les triangles en dessous correspondent aux insertions dans la souche comparée. Par souci de clarté, seules les insertions d'au moins 10 gènes prédits sont présentées. La hauteur d'un triangle reflète le nombre de gènes impliqués dans l'insertion (l'échelle à droite du chromosome indique le nombre de gènes). Les triangles colorés correspondent à des exemples de points chauds d'insertion. D'après Tidjani et al. 2019b.

Cette richesse en événements de recombinaison dans les bras (donnant la courbe en forme de « sourire » dans la figure 7), est également observée avec plus d'amplitude au niveau du genre *Streptomyces* (Choulet et al., 2006; Lorenzi et al., 2021). Même si les raisons de cette plus grande plasticité génétique apparente au niveau des bras sont encore mal connues et potentiellement multiples (lié au premier événement de linéarisation du chromosome avec un plasmide linéaire laissant aux extrémités des gènes accessoires, meilleure tolérance aux remaniements chez ces gènes accessoires que dans les gènes core, lié à des systèmes de réparation de l'ADN), nous pouvons spéculer ici que les indels observés au niveau de la population, une fois cumulés sur des temps évolutifs plus longs, sont à l'origine de la compartimentation génétique observée à des niveaux taxonomiques supérieurs.

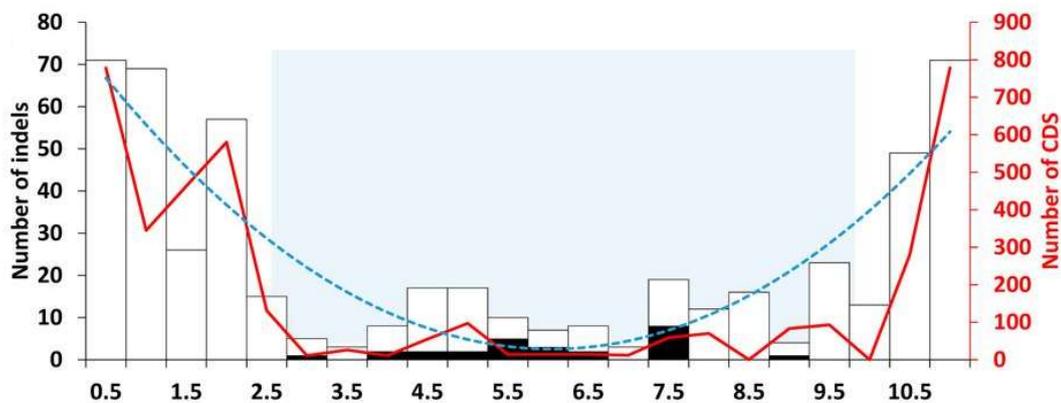


Figure 7 : Le schéma représente la distribution de tous les événements d'indels identifiés au sein de la population par des comparaisons deux à deux de génomes. Chaque barre de l'histogramme correspond au nombre d'indels dans une fenêtre de 0,5 Mb. La proportion d'insertions ICE/AICE (éléments conjugatifs intégrés au chromosome) dans une fenêtre est indiquée en noir. La ligne bleue en pointillés (courbe « sourire ») correspond à la courbe de tendance polynomiale (ordre 2, valeur R^2) de la distribution des indels. La courbe rouge montre le nombre de gènes dans les indels dans une fenêtre donnée. D'après Tidjani et al. 2019b.

Un exemple frappant de cette diversité sub-télomérique des souches de notre population a été observé au niveau de leurs TIR et de leurs télomères. Pour les TIR, si leur variabilité en taille avait déjà été reportée au niveau inter- et intra-spécifique (Wenner et al., 2003; Hopwood, 2006), nous avons pu montrer qu'il en était déjà de même au niveau de la population et que ces structures étaient hautement recombino-gènes avec l'identification à leur niveau de 45 événements de recombinaison uniques (translocation, inversion, indel) (Tidjani et al., 2020). Concernant les télomères, 4 séquences télomériques différentes du télomère archétype et parfois très différentes entre elles (30 % d'identité en nt) ont été observées chez nos 11 souches (figure 8). Cette variabilité inattendue était de plus corrélée avec des systèmes TP/TAP différents du système archétype souvent plus proches du système de *S. griseus*. L'analyse comparée des séquences télomériques a montré que de nombreux événements de recombinaison durant l'histoire évolutive de la population étaient à l'origine de cette diversité avec potentiellement des échanges entre souches, mais également avec des plasmides linéaires. Nos

résultats ont montré que les extrémités chromosomiques des *Streptomyces*, bien que essentielles pour le maintien de l'intégrité du génome, étaient donc très dynamiques et sujettes à de nombreux réarrangements sur des temps évolutifs courts.

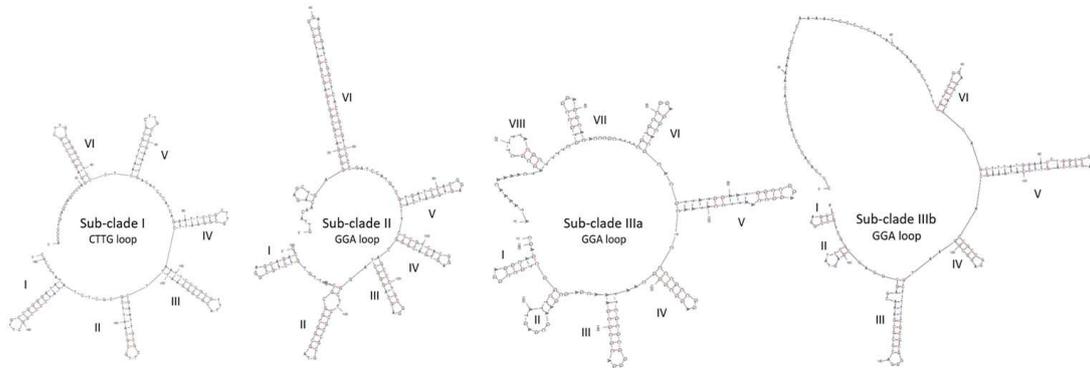


Figure 8 : Structures secondaires prédites des différents télomères des souches de la population. Une séquence représentative de chaque groupe de télomères est représentée. D'après Tidjani et al. 2020.

Les éléments génétiques mobiles sont nombreux et dynamiques au sein d'une population de *Streptomyces*

Chez les *Streptomyces*, l'absence de transformation et de phages transducteurs font de la conjugaison le mécanisme principal de transfert de gènes (Stuttard; Burke et al., 2001). La conjugaison chez les *Streptomyces* est médiée soit par des plasmides linéaires ou circulaires de tailles variables (quelques kb à plusieurs centaines), soit par éléments conjugatifs intégrés au chromosome (Bordeleau et al., 2012). Ces derniers sont de deux types : les ICE (pour Integrative and conjugative Elements) qui dépendent d'un système de sécrétion de type IV pour assurer le transfert d'ADN d'une cellule à une autre et les AICE (pour Actinomycete ICE) spécifiques des bactéries de l'ordre des Actinomycetales. Les AICE ont la particularité de transférer l'ADN de l'élément via une unique translocase à ADN (Tra). Cette dernière est apparentée au système FtsK/spoIIIE permettant la ségrégation des chromosomes durant la division cellulaire et la sporulation. Tra agit comme une pompe à ADN et permet (contrairement au T4SS) le recrutement d'ADN double brin en ciblant des séquences de l'élément nommées *clt* pour cis-acting locus of transfer (Thoma and Muth, 2012) (figure 9)

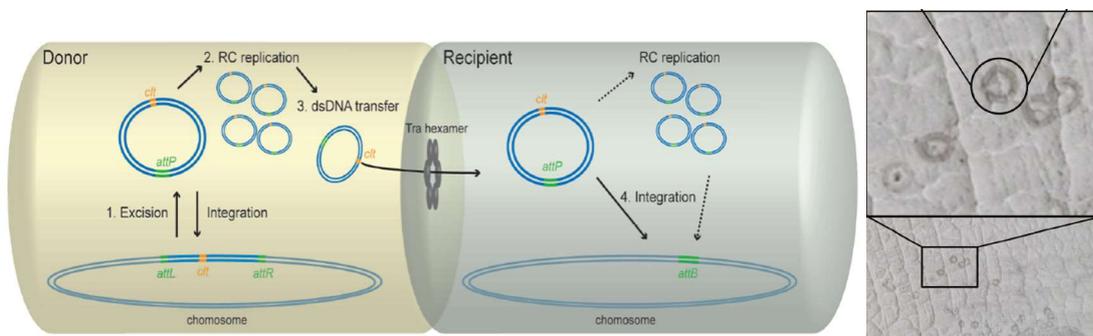


Figure 9 : Transfert des AICE. A gauche, schéma des différentes étapes du transfert d'un AICE. Adapté de Bordeleau et al. (2012). A droite illustration de pocks à différents grossissements (encadrés) observés sur boîte de Pétri. Adapté de Thoma & Muth (2015). RC : répliation en cercle roulant. ds : double brin, clt : cis-locus acting of transfer.

. L'AICE est ensuite transféré par un pore formé entre les cellules donatrice et réceptrice par un hexamère de Tra et en utilisant sa propre activité ATPase. L'AICE ainsi transféré peut s'intégrer directement dans le chromosome hôte ou optionnellement se répliquer avant par cercle roulant. L'intégration se fait par recombinaison site spécifique entre des sites *attP* et *attB* respectivement présents sur l'élément et le chromosome hôte (Ghinét et al., 2011) et conduit à la création de répétitions directes (DR). Une autre particularité de la conjugaison des AICE chez les *Streptomyces* est la formation, lors d'expériences de conjugaison sur boîte, de zones de ralentissement de croissance chez les receveuses appelées « pocks » due à la diffusion de l'élément dans le mycélium adjacent (Thoma and Muth, 2015). Ce phénomène serait assuré par des gènes *spd* (pour spread) retrouvés dans une majorité des AICE (Thoma et al., 2016).

Dans le cadre de la thèse de C. Choufa (octobre 2018) nous avons entrepris de caractériser le contenu en éléments potentiellement conjuguatifs dans les génomes des 11 souches séquencées. Ainsi, 7 plasmides (3 linéaires et 4 circulaires) ont été détectés lors du séquençage. Une recherche d'ICE dont le transfert dépend d'un système de sécrétion de type IV a été réalisé grâce au logiciel ICEScreen (Lao et al. unpublished). Pour les AICE, comme leur signature distinctive est la présence du gène *traB* codant la protéine de transfert Tra, nous nous sommes concentrés dans un premier temps sur sa détection en utilisant des profils HMM et des Blast. Dans un second temps, les gènes d'intégrase spécifiques du site (intégrases tyrosine ou sérine) et les gènes de fonction de répllication ont été recherchés à proximité. La présence de répétitions directes résultant de la duplication du site d'insertion a permis de délimiter l'élément et de finaliser sa détection. Lorsqu'un élément possédait les trois étiquettes (TraB, intégrase et répllicase), nous l'avons considéré comme étant un AICE putativement fonctionnel. Au total, 43 AICE et 2 ICE potentiellement autonomes ont été détectés. Huit DAICE (Defective AICE) et 9 IME (integrative and mobilisable element), respectivement des AICE et IME pour lesquels des fonctions de mobilité manquaient ont également été identifiés (Figure 10 A). Chaque souche possédait entre 3 et 7 éléments (5 en moyenne) avec une distribution plus importante dans les régions centrales du chromosome où se concentre le core génome des *Streptomyces* et notamment des gènes de tRNA ou ribosomiques qui représentent des cibles privilégiées des intégrases

Des intégrations de plusieurs éléments à un même site ont été observées. Ce phénomène est appelé accréation (Bellanger et al., 2011) et s'explique principalement par la reconnaissance et l'intégration successive de différents éléments au niveau de ce site. Comme elle conduit à la création de DR similaires entre tous les différents éléments intégrés, l'excision d'un élément accréé peut donc également transférer en *cis* un autre élément, en fonction de la DR impliquée lors de l'événement de recombinaison. La comparaison de la distribution des éléments entre souches avec la phylogénie de ces dernières n'a pas permis de mettre en évidence un transfert récent d'AICE entre nos 11 souches. Toutefois, aucun AICE (et ICE) n'est partagé par l'ensemble de la population et 15 d'entre eux sont même uniques à une seule souche ce qui suggère une forte dynamique d'acquisition et/ou de perte de ces éléments lors de la diversification de la population. Afin de les comparer entre eux, les AICE ont été regroupés en familles sur la base du pourcentage d'identité de TraB (> 95% d'identité en acides aminés). Cette comparaison au niveau des gènes impliqués dans la mobilité de l'élément a montré des associations de TraB avec des intégrases différentes pouvant changer leur spécificité d'intégration. Elle

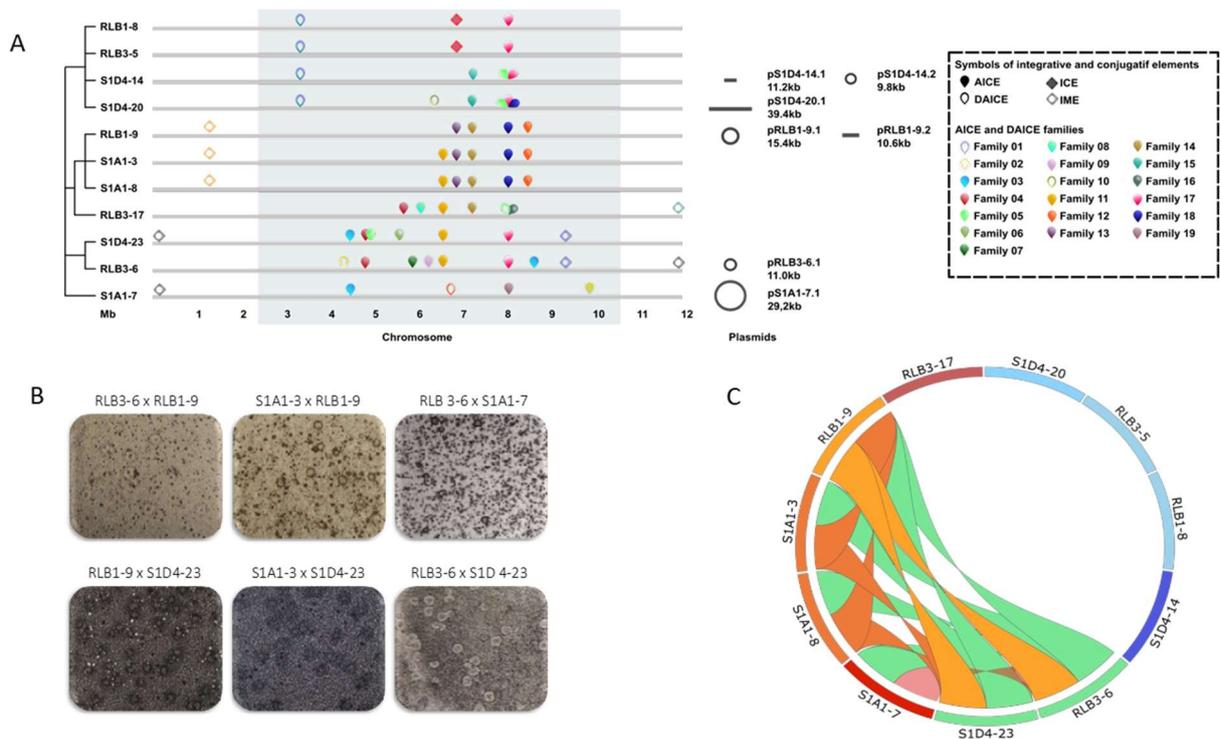


Figure 10 : Localisation et transfert des éléments conjugatifs de la population. **A)** Localisation des AICE et ICE dans les différentes souches de la population. Les rectangles schématisent les chromosomes des souches avec une échelle en Mb. Le nom des souches est indiqué à gauche ainsi que leur relation phylogénétique sous forme d'un arbre réalisé sur leur core génome. Les plasmides (linéaires ou circulaires) présents dans les souches sont représentés à droite des chromosomes. Les ovales et losanges représentent la position approximative des différents AICE et ICE respectivement. Plusieurs symboles à une même position indiquent un phénomène d'accrétion. Les éléments défectifs dans leur capacité de mobilité sont respectivement appelés DAICE (Defective AICE) et IME (Integrative and mobilisable element) et sont représentés par des symboles vides. Les couleurs représentent des éléments appartenant à différentes familles d'AICE sur la base de leur protéine TraB. **B)** Illustration de la diversité des pocks observés entre souches de la population. Les paires de souches croisées sont indiquées au-dessus, avec en premier le nom de la souche donatrice. **C)** Représentation sous forme de Circos de l'observation de pocks entre souches de la population. La première partie du rectangle indique que la souche était utilisée comme donatrice, la seconde partie comme réceptrice. Un ruban reliant deux souches indique que des pocks ont été observés entre ces couples.

a également mis en évidence des phénomènes de délétion de gènes de mobilité, conduisant à la création de DAICE. Dans les cas les plus extrêmes, seuls certains gènes flanqués de DR ont été identifiés comme vestiges de la présence d'un AICE. Ces phénomènes de dégradation ont également pu être mis en évidence au niveau des gènes cargos qui sont des gènes ne codant pas pour la mobilité de l'élément, mais qui sont susceptibles de bénéficier à la cellule hôte ou au maintien de l'élément (e.g. systèmes d'addiction). Parmi ces gènes cargos des phénomènes importants de pseudogénéisation ont pu être mis en évidence (42% de pseudogènes contre 7 % pour le génome). Ces résultats indiquent donc que les éléments, une fois intégrés sont soumis à des fortes pressions de sélection concernant leur intégrité et leur maintien.

Afin de confirmer le caractère fonctionnel des AICE au sein de la population, des expériences de conjugaison deux à deux ont été réalisées entre toutes les souches de notre population. Le transfert d'AICE a été observé par la formation de pocks (Figure 10B). Sur 110 couples testés, 13 en ont formé. La moitié des souches n'ont pas été impliquées dans la formation de pocks que ce soit en tant que

donneuses ou receveuses, alors que certaines se sont révélées plus aptes à donner ou recevoir (Figure 10C). Le passage d'un AICE a pu ensuite être confirmé par PCR dans les souches réceptrices au sein d'un pock. De manière intéressante le transfert concomitant de plusieurs AICE d'une souche donneuse à une réceptrice au cours d'un événement conjugatif a pu être observé pour la première fois.

L'ensemble de ces résultats a montré une prévalence importante des AICE dans notre population liée à une forte dynamique de transferts pouvant notamment reposer sur des transferts multiples lors de la conjugaison. Ces éléments semblent préférentiellement géolocalisés sur le chromosome avec notamment certains sites permettant l'accrétion de plusieurs d'entre eux. Au niveau de l'AICE, des événements de recombinaison ou de délétions importants impliquent également des devenir différents, même pour des éléments acquis verticalement entre souches proches, conduisant en plus d'une variabilité inter-souches à une variabilité inter-éléments importante, suggérant que les AICE constituent des éléments génétiques à l'histoire évolutive complexe.

La diversité génomique peut servir de lien cohésif au niveau de la population

La définition de la population implique une coexistence des individus sous des mêmes pressions de sélection avec des conséquences écologiques et génétiques. Au niveau écologique, cela permet l'émergence d'interactions, voire de comportements sociaux. C'est le cas chez les bactéries et l'étude des populations a permis de ne plus considérer les bactéries d'une même espèce comme des êtres unicellulaires identiques et indépendants, mais comme des organismes en constante interaction avec leurs congénères (Cadillo-Quiroz et al., 2012; Shapiro et al., 2012; Kashtan et al., 2014; Chase et al., 2021). Ces interactions peuvent être de différents types et impliquer des phénomènes de communication (Stefanic and Mandic-Mulec, 2009), d'utilisations de biens communs et de partage du travail (Pande et al., 2020) ou au contraire concerner des phénomènes antagonistes (Cordero et al., 2012b, 2012a). Dans ce sens, nous nous sommes intéressés de manière non exhaustive aux gènes et fonctions présents dans certaines régions génomiques variables de nos souches et plus particulièrement à une situation où trois cas différents ont été rencontrés (figure 11). Au niveau d'une rupture de synténie entre leurs chromosomes, certaines souches présentaient 10 kb ne codant pas de fonctions prédictives, d'autres avaient 90 kb dont des gènes potentiellement impliqués dans la production cyclodipetides et les dernières possédaient une région de 220 kb avec des gènes codant des Non Ribosomal peptide synthetases (NRPS), les cyclodipetides et les NRPS pouvant avoir des activités antibiotiques. Par des approches de génétique reverse, nous avons ainsi pu montrer que seules les souches possédant le NRPS étaient capables d'inhiber la croissance d'un *Bacillus* isolé du même sol. En revanche ce NRPS n'était pas capable d'inhiber la croissance des souches de la population ne possédant par ce cluster de gène. La production de ce NRPS servait donc de bien commun dans nos conditions expérimentales, montrant que des interactions synergiques existaient entre souches, leur permettant de profiter des gènes et des fonctions produites par leurs consœurs. Le flux de gène important permettant la diversification de nos souches représenterait ici une façon de diversifier le pool de gènes de la population est permettre l'apparition de comportements sociaux.

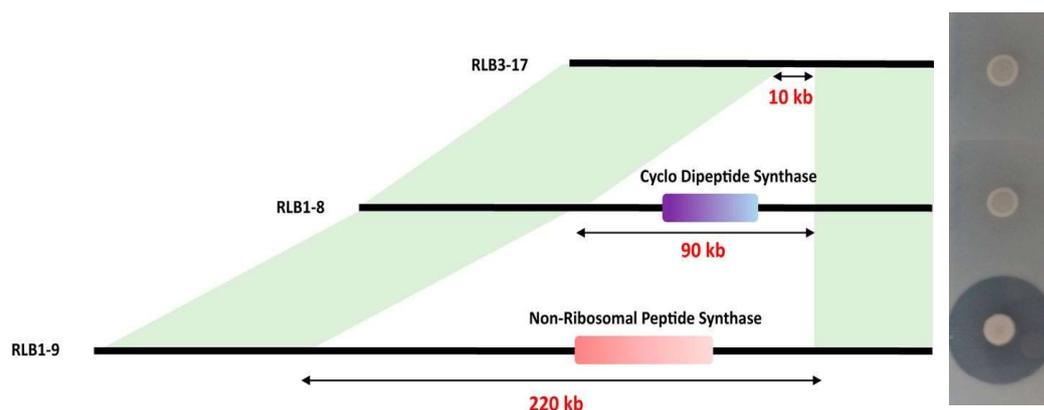


Figure 11 : Identification de gènes variables dans un point chaud de variabilité génomique. Le schéma illustre un point chaud de variabilité observé entre trois souches (RLB3-17, RLB1-8, et RLB1-9). Dans deux d'entre elles, des clusters de gènes de biosynthèse différents ont été prédits par antiSMASH : l'un incluant une cyclodipeptide synthase ARNt-dépendante dans RLB1-8 et l'autre incluant un NRPS (Non Ribomosomal Polyketide Synthase) dans RLB1-9. Les régions en vert clair correspondent aux régions synténiques. La partie droite représente des tests d'inhibition de croissance réalisés sur une souche de *Bacillus* sp. inoculée en masse dans une gélose. Seule la souche RLB1-9, possédant le NRPS, a montré un halo d'inhibition de la souche de *Bacillus*. Cette capacité est perdue chez un mutant NRPS (résultat non présenté). D'après Tidjani et al. 2019b.

Premières conclusions sur l'étude d'une population de *Streptomyces*

Les résultats concernant cette étude d'une population *Streptomyces* ont été publiés dans 3 articles dans le cadre de la thèse de Razak Tidjani (co-dirigée avec Pierre Leblond) et en collaboration avec Olivier Lespinet de l'I2BC/Université Paris Saclay. Un article est également en préparation dans le cadre de la thèse de Caroline Choufa (co-dirigée avec Pierre Leblond et en collaboration avec Michiel Vos de l'Université d'Exeter). En associant des approches de génomique comparative, de génétique et de microbiologie, l'ensemble de nos résultats a permis de montrer que des souches appartenant à une même population de *Streptomyces* et pouvant être considérées comme clonales sur des critères classiques de taxonomie étaient en fait toutes différentes en termes de présence et absence de gènes. Ces variations pouvant représenter plusieurs pourcents de leur génome sont dues à leur plasticité génétique importante et à un flux massif de gènes s'étant produit en conditions naturelles dans le sol et sur des temps évolutifs courts. Les éléments génétiques mobiles tels que les AICE semblent associés à ces mécanismes de transfert de gènes et pourraient être même multiples entre souches. Ces différences en contenus en gènes permettent une différenciation effective des fonctions de chacune des souches et éventuellement à une adaptation à de nouvelles conditions, pouvant conduire *in fine* à la différenciation de certaines souches en de nouvelles populations. A l'inverse, nos résultats ont suggéré ici que cette variabilité pourrait servir à l'ensemble de la population en tant que biens communs et être impliquée dans la cohésion sociale de la population.

4.2 Exploitation de la diversité des *Streptomyces*

4.2.1 Développement de biosenseurs de la dégradation du bois

Le bois est constitué dans sa grande majorité de l'assemblage de trois biopolymères : la cellulose, les hémicelluloses et la lignine qui se retrouvent en proportions variables selon les essences. Le reste du bois est composé de pectine et de substances de faibles poids moléculaires (extractibles, cendres) présents en faibles quantités (Folman et al., 2008). Malgré une composition chimique relativement simple, ce matériau est très résistant, notamment grâce à son imperméabilité et à sa faible présence d'eau qui empêchent le développement de microorganismes. C'est pourquoi sa dégradation est un mécanisme relativement complexe résultant le plus souvent de la conjonction de facteurs biotiques et abiotiques qui agissent en synergie (Martínez et al., 2005). Cette biodégradation du bois est un mécanisme écologique essentiel car elle permet le recyclage de la matière carbonée et la bonne réalisation des cycles biogéochimiques au niveau des écosystèmes forestiers. Cette dégradation lorsqu'elle concerne le bois matériaux, représente en revanche un problème socio-économique majeur. Ce problème est d'autant plus prégnant que le bois est de plus en plus utilisé dans les constructions humaines.

En industrie, la biodégradation par les micro-organismes (champignons et bactéries) est généralement considérée comme la principale menace pour la préservation à long terme du matériau bois (Råberg et al., 2005). Pouvoir empêcher la dégradation du bois par les microbes a donc d'importants débouchés industriels et de nombreux procédés sont développés dans ce sens (biocides, autoclavage...). Ces études sur la préservation du bois impliquent de pouvoir détecter quand le bois est attaqué. Cependant, comme ce phénomène commence à l'échelle microscopique, il est difficile à détecter précocement, notamment avant que le bois ne soit structurellement altéré. Ainsi, les tests standards pour confirmer une dégradation (par exemple EN 113, EN 252) reposent généralement sur la perte de masse d'une pièce de bois, après plusieurs semaines en présence des micro-organismes. Cette échelle de temps est longue et ralentit les travaux de recherche dans ce domaine. L'objectif de ce travail a été de développer une méthode alternative aux outils métrologiques actuels dans le domaine de la préservation du bois et de proposer une méthode biologique de détection de la dégradation précoce du bois matériau avant toute perte de masse mesurable.

La biodégradation du bois suit généralement un processus séquentiel qui est initié par des champignons xylophages (Folman et al., 2008). Ces derniers vont en premier lieu dégrader la lignine, composé le plus résistant du bois, grâce à divers arsenaux enzymatiques. Cette primo dégradation donne accès à la cellulose et aux hémicelluloses composés plus facilement dégradables et riches en carbone (Martínez et al., 2005). La cellulose est un biopolymère de glucose pouvant être dégradé par différents systèmes enzymatiques (Bornscheuer et al., 2014). Toutefois, sa dégradation se fait toujours par un raccourcissement de cette fibre en des formes plus simples : la cellobiose (2 glucoses) ou des cellodextrines (3 à 6 glucoses) dont la présence représente une signature de l'attaque du bois (Langston et al., 2011). Ces composés étant facilement assimilables par nombre de microbes, ils participent à la colonisation du bois dégradé par une communauté microbienne cellulolytique plus diverse, dont font partie les *Streptomyces* (Stursová et al., 2012).

Au cours de ce travail, nous avons identifié le régulateur CebR précédemment caractérisé chez quelques espèces de *Streptomyces* (Schlösser et al., 2000; Takasuka et al., 2013) qui est capable de détecter la cellobiose ou les cellodextrines et d'activer en leur présence divers gènes impliqués dans l'activité

cellulolytique. CebR a été caractérisé comme un répresseur transcriptionnel se fixant en amont des gènes qu'il régule sur une boîte conservée de 22pb (CebR Box) (Marushima et al., 2009). Une analyse génomique nous a permis de démontrer que ce système était largement distribué et conservé chez les *Streptomyces* et qu'il était possible de construire un biosenseur canonique utilisable par la plupart des espèces et souches des bactéries de ce genre. La région régulatrice consensus reconnue par CebR a ainsi été détournée dans des fusions transcriptionnelles avec des gènes marqueurs. Ces constructions ont été introduites par génie moléculaire dans différents *Streptomyces* modèles ou environnementaux de notre première collection de bactéries de sol forestier afin d'assurer leur contrôle par leur CebR endogène (Figure 12).

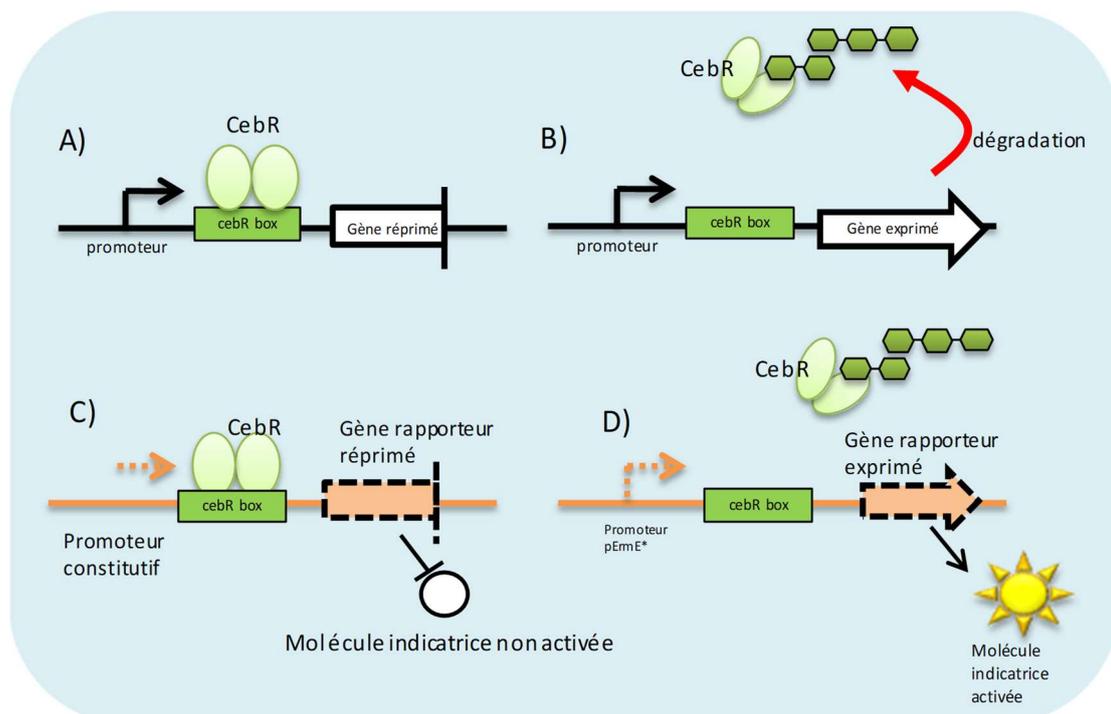


Figure 12 : Fonctionnement du système CebR et du biosenseur de la dégradation du bois. En A) et B) est représenté le fonctionnement du système CebR pour la détection de cello-oligosaccharides par *Streptomyces* et en C) et D) le détournement de ce système pour la création du biosenseur. **A)** En absence de composés de dégradation du bois, la protéine CebR se fixe sur la boîte CebR (séquence TGGGAGCGTCCCA) située dans la région promotrice des gènes qu'elle régule et en inactive l'expression. **B)** En présence de cello-oligosaccharides, la protéine CebR change de conformation, ne se fixe plus sur la boîte CebR levant ainsi la répression des gènes régulés et permet leur expression. **C)** Le biosenseur consiste en une boîte *cebR* clonée entre un promoteur constitutif permettant l'expression d'un gène rapporteur (gène *xyIE* codant un dioxygénase). En absence de composés de dégradation du bois, la protéine réprime l'expression du gène rapporteur. **D)** En présence de cello-oligosaccharides la répression du gène rapporteur est levée et permet la production de la molécule indicatrice qui métabolise le

Afin de sélectionner une souche bioindicatrice optimale, plusieurs ont été transformées et testées afin d'estimer leur sensibilité et leur spécificité de détection de composés de dégradation du bois. Une souche bioindicatrice a été sélectionnée et a permis de détecter la présence de molécules indicatrices dans un milieu de culture à une concentration proche de celle mesurée dans du bois en dégradation (Figure 13). Ce biosenseur a été testé dans des conditions similaires à celles de la norme EN 113 et a permis une détection 4 fois plus rapide de la dégradation d'une essence du bois par rapport à ce test de référence.

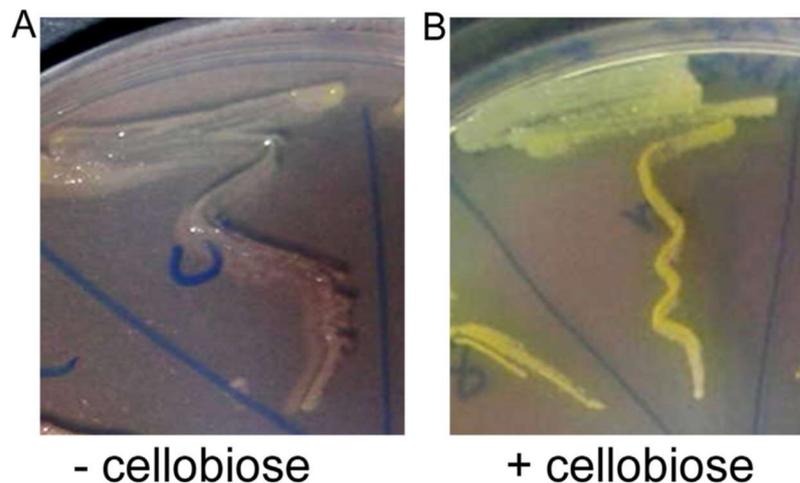


Figure 13 : Illustration de la détection de cellobiose par la souche bioindicatrice. **A)** En absence de cellobiose, la souche bioindicatrice S4N27 présente une couleur blanche. **B)** En présence de cellobiose dans le milieu de culture, la souche devient jaune suite à l'activation du système biosenseur qui métabolise du catéchol en substrat jaune. D'après Toussaint et al. 2016

Cette étude a été réalisée en collaboration avec le LERMAB (Arnaud Besserer, Philippe Gérardin) dans le cadre de la thèse de Maxime Toussaint co-dirigée avec Pierre Leblond. Elle a été publiée dans J. biotech (Toussaint et al. 2016) et a conduit à un brevet international (WO/2016/131665 ; 28/08/16).

4.2.2 Coculture et biomolécules

Les biomolécules représentent une ressource majeure d'antibiotiques, d'antifongiques, d'anticancéreux ou d'antiparasitaires et ont révolutionné la médecine humaine. Par exemple, les antibiotiques, depuis leur découverte il y a 80 ans, ont permis à eux seuls d'augmenter notre espérance de vie en soignant des maladies infectieuses autrefois incurables ou en évitant des complications après certains actes chirurgicaux. Toutefois, l'émergence de bactéries pathogènes multi-résistantes aux antibiotiques constitue dès aujourd'hui un réel problème de santé publique (Cassini et al., 2019). Ce dernier va en s'accroissant et certaines études prédisent qu'il y aura d'ici 2050 autant de morts par maladies infectieuses que par les cancers (10 millions de décès par an) (O'Neill J, 2014). Si limiter l'émergence des bactéries multirésistantes est crucial, identifier de nouvelles molécules et activités antimicrobiennes reste important sur le moyen terme.

Les métabolites secondaires des bactéries représentent une source importante de molécules bioactives d'intérêt médical. Une grande diversité de ces molécules est produite par les champignons et les actinomycètes. Chez ces derniers, les *Streptomyces* à eux seuls représentent la source d'environ la moitié des antibiotiques utilisés dans la pharmacopée humaine et vétérinaire (Labeda et al., 2017). Cependant la découverte de nouvelles classes de molécules décroît depuis de nombreuses années et des structures déjà connues sont principalement redécouvertes par les criblages classiques. Ce constat a entraîné un désintérêt des compagnies pharmaceutiques dans la recherche de nouvelles molécules d'origine bactérienne. Les dernières découvertes de molécules originales ont effectivement fait appel à de nouvelles techniques parfois complexes comme des méthodes de culture innovantes (Ling et al., 2015) ou à l'utilisation d'intelligence artificielle (Stokes et al., 2020).

Le séquençage de génomes de *Streptomyces* a révélé que la plupart de ces bactéries possédaient un nombre de clusters de gènes potentiellement impliqués dans la synthèse de MS beaucoup plus important que le nombre de molécules produites de manière effective au laboratoire (van Bergeijk et al., 2020). De même des études intensives de *S. avermitilis*, connue depuis 1978 comme produisant l'anthelminthique avermectine, ont permis d'isoler 20 MS de cette souche. Or l'analyse de son génome a révélé 38 BGC (pour Biosynthesis gene cluster) dont seulement 16 ont pu être associés à la production des MS isolés jusqu'à présent (Ikeda et al., 2014). Ces exemples montrent que la plupart des MS sont donc cryptiques en conditions de laboratoire conduisant à une sous-estimation du réel potentiel de leur production par les *Streptomyces*. Ceci reste d'autant plus vrai que si des gènes clés de la production de métabolites appartenant à des familles déjà connues (NRPS, PKS) sont facilement identifiables, de nouvelles voies ne possédant pas de gènes signatures restent non prédictibles *in silico*.

Afin de lever ces verrous, de nombreuses techniques de culture ont été développées pour permettre l'expression de ces BGC que ce soit chez les *Streptomyces* ou d'autres bactéries. Certaines sont basées sur une exploration des conditions de culture comme l'approche OSMAC (One Strain Many Compounds) visant à cultiver la même souche dans différents milieux de culture utilisant différentes sources nutritives (carbone, phosphore, azote...) ou en complétant le milieu de culture avec des éliciteurs potentiels. La manipulation génétique comme l'échange de promoteurs (Ochi et al., 2004), la biologie de synthèse ou l'altération de cascades de régulation ont pu être utilisés (Aigle and Corre, 2012). Par exemple, les stambomycines de *S. ambofaciens* a pu être produite en exprimant de manière constitutive un régulateur présent dans son cluster de BGC (Laureti et al., 2011). L'utilisation de cocultures constitue également une approche prometteuse permettant l'expression de BGC cryptiques en réponse à des signaux moléculaires mimant des interactions microbiennes ayant lieu dans l'environnement. Les avantages de cette approche sont nombreux. Elle est peu coûteuse, simple à mettre en œuvre et ne requiert pas de connaissances préalables quant à la régulation de la synthèse des molécules que l'on cherche à induire. Différents types de coculture ont été utilisés avec les *Streptomyces*, comme d'autres actinomycètes (Traxler et al., 2013), des bactéries contenant des acides mycoliques (Hoshino et al., 2019) comme par exemple *Tsukumurella pulmonis*. Cette dernière, co-cultivée avec plus de 100 espèces de streptomycètes, a permis de produire de nouveaux métabolites dans plus d'un tiers des cocultures et/ou d'augmenter la production de métabolites connus (Onaka, 2017). La coculture entre champignons, et particulièrement avec des Basidiomycètes dégradeurs du bois qui produisent de nombreux métabolites et vivent dans des communautés bactériennes complexes est également prometteuse. Des cocultures entre des *Trametes versicolor*, *Bjerkandera adusta* et *Hypholoma fasciculare* ont montré des changements importants dans le métabolome, dont des laccases impliquées dans la dégradation du bois (Eyre et al., 2010; Hiscox et al., 2010). Des cocultures entre *Streptomyces*

et *Aspergillus nidulans* ont également permis de réveiller des métabolites cryptiques chez le champignon (Schroeckh et al., 2009).

Dans le cadre de la thèse de Matthieu Nicault (financée par LUE), nous avons exploré le potentiel de production de MS d'une communauté de *Streptomyces*. Pour cela, 8 souches d'une communauté de *Streptomyces* (souches plus ou moins proches taxonomiquement et isolées conjointement à petite échelle spatiale (mm-cm) ont été choisies. Après séquençage (Nicault et al. 2020), les clusters de gènes de biosynthèse codant potentiellement des MS de types NRPS, polyketide synthase (PKS), Ribosomal peptide synthetase (RiPP) ou terpènes ont été recherchés par genome mining (logiciel antiSMASH) (Blin et al., 2019). Deux cent soixante et un BGC ont été détectés au sein de la communauté (Nicault et al., 2020a). Une grande partie (n=53) était spécifique à une seule souche quand seulement 5 étaient communs à toutes, montrant que cette communauté constituait un réservoir important de gènes d'intérêt (Figure 14).

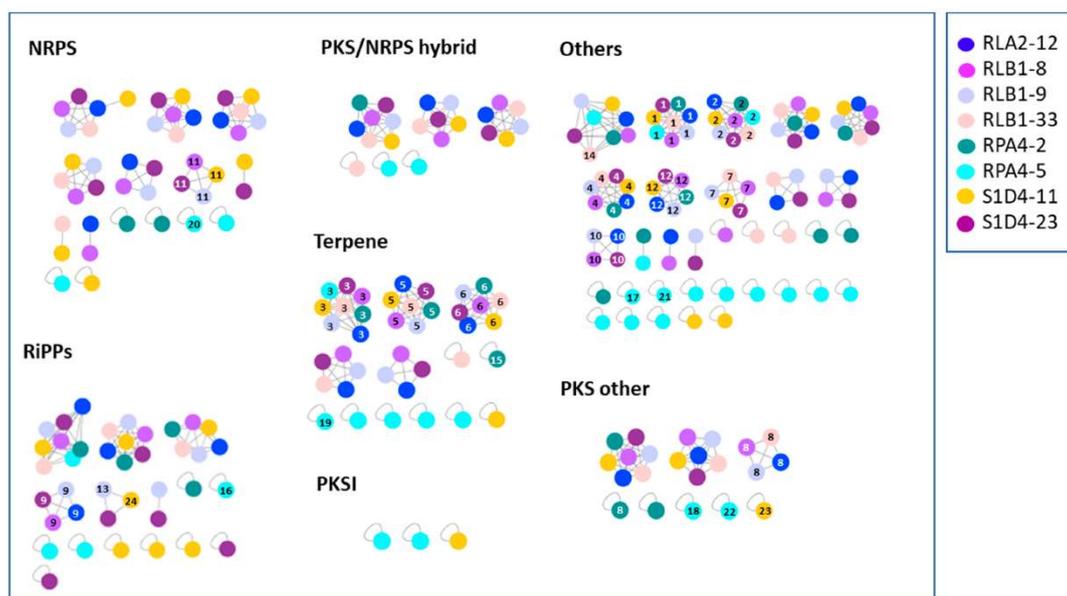


Figure 14 : Réseau de similarité des BGC prédits. Après prédiction *in silico*, les BGC partagés par nos 8 souches ont été représentés dans des réseaux où les BGC similaires entre différentes souches sont reliés par une ligne. Les BGC uniques à une souche sont symbolisés par un singleton. Chaque souche est représentée par un code couleur. Les BGC numérotés correspondent aux BGC dont le produit final peut être potentiellement prédit. 1, desferrioxamin B/E; 2, ectoin; 3, hopene; 4, spore pigment hybrid; 5, geosmin; 6, albaflavenone; 7, 2-methylisoborneol hybrid; 8, alkylresorcinol; 9, lanthipeptide A; 10, pepticinnamicin E; 11, diisonitrile antibiotic SF2768; 12, melanin; 13, siamycin I; 14, sarpeptide A/B; 15, 2-methylisoborneol; 16, albusnodin; 17, lydicamycin; 18, JBIR-76/77; 19, isorenieratene; 20, deimino-antipain; 21, lanthipeptide hybrids; 22, spore pigment; 23, lugdunomycin; 24, MS-271 (lassopeptide). D'après Nicault et al. 2020b.

Une analyse métabolique a ensuite montré que même si elles produisaient un socle commun de métabolites pouvant correspondre à du métabolisme primaire, toutes les souches avaient un profil spécifique et des capacités de production différentes (Nicault et al., 2021).

Afin de prospecter plus avant la capacité de production des MS par ces souches, nous les avons ensuite co-cultivées en présence de champignons (figure 15). Une collection de 9 champignons, pour la plupart dégradeurs du bois, a été fournie par le laboratoire laM. Après mise en place des conditions de

croissance, nous avons dirigé notre approche en sélectionnant les cocultures permettant d'élucider une inhibition de croissance d'une souche *Bacillus subtilis* absente chez les contrôles (mono-cultures de chacun des partenaires). Deux couples ont ainsi été sélectionnés et l'analyse du métabolome de leur zone d'interaction réalisée. Après fractionnement une trentaine de composés sont apparus comme étant des candidats activés par la coculture et potentiellement responsables de l'activité antimicrobienne.



Figure 15 : Illustration d'une co-culture entre un *Streptomyces* et un champignon après 14 jours. La zone d'interaction a été prospectée pour rechercher des molécules élicitées au cours de l'interaction.

Ces travaux réalisés dans le cadre de la thèse de Matthieu Nicault ont conduit à 3 publications en collaboration avec Pierre Leblond et Eric Gelhaye du laboratoire IaM (Université de Lorraine, Nancy) (codirecteurs de la thèse) et également avec Patrick Chaimbault du laboratoire LCP-A2MC (Université de Lorraine, Metz) pour les analyses biochimiques.

4.3 Projets connexes

J'ai pu au travers ma thèse et mes post-doctorats acquérir une certaine expertise dans l'étude de la diversité des bactéries et notamment en taxonomie, phylogénie, évolution et écologie microbienne. J'ai pu mettre cette expérience à profit dans mes projets actuels au laboratoire Dynamic, mais aussi ponctuellement lors de différentes collaborations. J'ai ainsi pu collaborer en 2014 avec l'ENSAIA (Frédéric Borges, LIBIO, Nancy) dans le typage de souches de *Carnobacterium maltaromaticum*, des bactéries lactiques présentes dans les fromages (Rahman et al., 2014). En 2018 avec Aurélie Deveau (INRA, IaM, Nancy) nous avons monté des projets consistant à caractériser des souches présentes dans les truffes et leurs zones de brûlés afin d'identifier d'éventuels composés herbicides. En 2019 avec l'Université de Reims (Marius Colin et Sophie Gangloff, laboratoire BIOS, Reims) j'ai participé à une étude sur l'impact de poignées de portes en cuivre sur la diversité de bactéries en milieu hospitalier (Colin et al., 2020). J'ai également co-encadré avec Philippe Duquenne et Pierre Leblond la thèse de **Jodelle Degois** (INRS, RPPE, soutenance 08/02/2018) en collaboration avec l'INRS (Nancy). Dans ces travaux, nous avons exploré via une approche de métagénomique la diversité bactérienne des bio-aérosols produits dans des centres de triage. Nos résultats ont permis de standardiser les techniques permettant de telles études (Degois et al., 2019) et de déterminer la composition et l'évolution des populations bactériennes et fongiques inhalées par le personnel au cours d'une année (Degois et al., 2017, 2019).

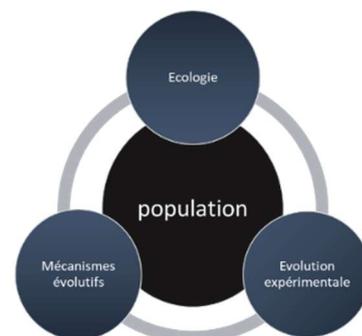
Projet

1. Projet dans le contexte du laboratoire

Le laboratoire DynAMic est focalisé dans l'évolution des bactéries par transfert de gènes et l'équipe StrAda dans la génétique des *Streptomyces*. Depuis mon recrutement dans ce laboratoire, mes travaux de recherche ont visé à **explorer la diversité des *Streptomyces***. Ils ont permis de renforcer un axe de recherche initié au laboratoire par Pierre Leblond et Bertrand Aigle visant à étudier l'écologie des *Streptomyces*, notamment en collaboration à l'origine avec Pascale Frey-Klett (laM-INRA Champenoux). Cet axe de recherche axé sur l'écologie microbienne a permis de s'inscrire et d'offrir une visibilité dans le tissu scientifique local, notamment avec le LABEX arbre qui est tourné vers l'écosystème forestier. **L'exploitation de cette diversité** par l'analyse fonctionnelle des *Streptomyces* dans un cadre écologique, et notamment à travers leur capacité à produire des métabolites spécialisés permet également un ancrage dans le projet impact biomolécule (LUE) et plus particulièrement dans le WP1 (interactions biotiques et voies de biosynthèse) de l'ancien programme et du futur WP1 (découverte et production de biomolécules et extraits actifs) en cours de montage et dont je suis un des co-porteurs. Ces axes de recherche ont permis également de commencer à créer un réseau de collaborations au niveau régional, national et international.

Je souhaite maintenant, dans une ligne directe à ces thématiques, continuer vers une meilleure compréhension de **l'évolution** des *Streptomyces*, que ce soit au niveau génétique et mécanistique. J'aimerais également m'intéresser aux causes et conséquences de ces phénomènes dans un contexte **écologique**. Ce projet permettra, je l'espère, de répondre à un niveau fondamental à des questions d'intérêt sur l'évolution non seulement des *Streptomyces*, mais des bactéries du sol en général.

Au cours de nos précédents travaux, nous avons commencé à créer et étudier les *Streptomyces* à l'échelle de la population. Ce cadre écologique comme niveau d'étude constituera un point d'ancrage et d'originalité dans ces futurs axes de recherche et servira de dénominateur commun entre les différents aspects de mon projet où j'essayerai de voir en quoi les populations de *Streptomyces* constituent des unités écologiques et évolutives. Ainsi, au niveau écologique nous pourrions voir i) comment les bactéries interagissent au sein d'une population et comment cette dernière évolue en termes de composition ; ii) si les interactions peuvent nourrir des comportements « sociaux » et être moteur pour l'établissement de fonctions ; iii) comment la population permet d'interagir avec d'autres organismes (par exemple les plantes) et en retour comment ces derniers influent son évolution. Au niveau évolutif, la proximité taxonomique permettra de lever certains verrous quant à la compréhension de la dynamique des transferts de gènes dans l'environnement et comment ils sont réalisés. Elle nous permettra également de simuler et de confronter nos différents scénarii dans le cadre d'expériences d'évolution expérimentale qui permettront d'intégrer nos résultats dans une compréhension plus générale des *Streptomyces* dans leur environnement.



2. Le transfert d'AICE est-il un moteur de la diversité des *Streptomyces* ?

2.1 Contexte

L'analyse par génomique comparée des génomes de souches conspécifiques d'une population nous a permis de mettre en évidence de nombreux indels entre des souches pouvant être considérées comme quasi-clonales sur la base de marqueurs phylogénétiques. Ces indels allaient d'une à une centaine de CDS et certains étaient associés à des éléments génétiques mobiles comme des **AICE** (pour Actinomycete Integrative and Conjugative Element). Si le transfert de ces éléments pouvait expliquer le transfert entre souches de fragments d'ADN de plusieurs kb, un des objectifs de mes futurs travaux sera de **comprendre comment les autres événements de rupture de synténie, pour lesquels aucune trace d'éléments mobiles n'avait été détectés, ont pu se produire**. Une hypothèse que nous testerons est le transfert de marqueurs chromosomiques (**TMC**) conjointement au passage des AICE. En effet, si la conjugaison chez la plupart des bactéries ne concerne généralement que le transfert de l'élément mobile, plusieurs mécanismes de TMC ont été décrits, dont chez les *Streptomyces*. Le plus célèbre est le système Hfr d'*E. coli* (Wollman et al., 1956) qui permet un TMC en cis et selon un gradient en fonction de la distance des marqueurs par rapport à l'*oriT* de l'élément. Toutefois, des exemples plus récents commencent à faire émerger de nouveaux mécanismes. C'est le cas chez *Yersinia pseudotuberculosis* qui d'une façon proche du système Hfr peut transférer des gènes chromosomiques suite à la cointégration d'un plasmide effectuée par une *Is6* (Lesic et al., 2012). Un système push-pull d'ADN impliquant une ATPase (jouant le rôle putatif de translocase chez une cellule donneuse) associée à la compétence naturelle de la cellule receveuse a récemment été découvert chez *Thermus thermophilus* (Blesa et al., 2017). Chez certains modèles l'ampleur du TMC est tel qu'il permet le transfert distributif de multiples segments d'ADN de tailles variables allant de quelques pb à plusieurs kb, indépendamment de leur position sur le chromosome. C'est le cas pour les mycoplasma où lors d'un événement conjugatif entre deux souches, 3 à 30 fragments de 49 pb à 64,7 kb peuvent être échangés (représentant 3 à 17% du génome) (Dordet-Frisoni et al., 2019) et permettrait notamment l'acquisition et la dissémination de résistances antibiotiques (Faucher et al., 2019). Même si les mécanismes associés à ce transfert sont encore mal connus, la présence d'un élément intégratif et conjugatif (ICE) chez au moins un des deux partenaires semble requise pour permettre un contact entre eux. De manière intéressante, le TMC s'effectue dans le sens opposé au transfert de l'ICE, c'est-à-dire de la souche sans ICE vers la souche possédant l'ICE (Dordet-Frisoni et al., 2014). Cette ampleur de transfert de marqueurs chromosomiques est encore plus marquée chez les mycobacteria. Lors d'un événement conjugatif un transconjugant acquiert ainsi en moyenne 575 kb de la souche donatrice (pour un génome de l'ordre de 7 Mb) distribués en environ 13 fragments d'ADN (de 59 bp à 226 kb). Il peut conduire dans les cas les plus extrêmes à des génomes mosaïques chez les transconjugants avec jusqu'à un quart du génome de la donatrice, distribué en une trentaine de fragments (Gray and Derbyshire, 2018). Ces mécanismes de transfert chez les mycobacteria sont conjugatifs, unidirectionnels et associés à un système de sécrétion de type VII permettant en moyenne une fréquence de transfert de 10^{-4} par donneur.

Chez les *Streptomyces* le TMC a été découvert lors d'expériences de complémentation de prototrophie où des phénotypes recombinants entre les chromosomes des souches donatrices et réceptrices été observés à des fréquences de 10^{-3} à 10^{-6} (Hopwood and Sermonti, 1963; Lee et al., 2011), voire 10^{-1} (Hopwood and Kieser, 1993). Malgré cette mise en évidence relativement ancienne, ce mécanisme reste mal connu. Récemment, il a été montré qu'il serait lié à l'action des translocases à ADN TraB des d'éléments génétiques mobiles de *Streptomyces*. TraB, en agissant comme une pompe à ADN double

brin, permet la mobilisation des plasmides conjugatifs via la reconnaissance de séquences répétées plus ou moins conservées nommées *clt* pour *cis*-acting locus of transfer. Néanmoins, la présence de séquences *clt* étant dispensable pour le transfert de marqueurs chromosomiques (Pettis and Cohen, 1994), ainsi que l'interaction physique directe des éléments (intégration en *cis*), il a été suggéré que les chromosomes possédaient leurs propres loci *clt* (nommés *clc* pour *clt* like sequence) permettant la reconnaissance par TraB. Ainsi, des analyses bioinformatiques ont réussi à détecter des séquences *clc* putatives dans différents génomes de *Streptomyces*, proches de la séquence des *clt* du plasmide pSHV1 (Dsouza et al., 1997). Si le réel rôle des *clc* n'a pas encore été entièrement démontré, la fixation par des expériences de gel retard de TraB de pSHV1 sur ces séquences a pu être montrée (Vogelmann et al., 2011), ainsi que la mobilisation de plasmides non-conjugatifs dans lesquels avaient été clonés des fragments *clc* (Thoma and Muth, 2016).

2.2 Evaluation du transfert de marqueurs chromosomiques par les AICE

L'étendue réelle du phénomène de TMC, ainsi que son impact sur la diversification des génomes restent encore inconnus chez les *Streptomyces*, et le fait de disposer d'une population constituera un cadre idéal pour répondre à ces questions. En effet, l'intégration des séquences co-transférées avec un élément génétique mobile se ferait principalement par recombinaison homologue chez l'hôte. Deux freins majeurs à cette étape clé étant l'absence de séquences homologues ou une trop grande diversité génétique, ces phénomènes seront minimisés chez nos souches quasi isogéniques et génétiquement très proches. Lors d'un transfert d'une portion de génome chez une receveuse, deux cas peuvent être distingués lors de son intégration par recombinaison homologue. Dans le premier, si les régions homologues flanquent des séquences non présentes dans le génome receveur, le phénomène de recombinaison permettra l'acquisition de matériel génétique supplémentaire et la création d'indels, comme observés dans notre population et identifiables par génomique comparative. Dans le second cas, le transfert va concerner des séquences qui, si elles ne sont pas identiques, différeront uniquement par du polymorphisme nucléotidique. Dans ce cas, l'origine parentale de la séquence sera définie par l'analyse de SNP (Single Nucleotide Polymorphism). Afin de tester ces deux hypothèses, nous avons entrepris la construction de souches marquées avec des résistances antibiotiques le long du chromosome de différentes souches donneuses et receveuses. Les souches choisies « pockaient » entre elles et présentent suffisamment de polymorphisme de séquence pour permettre de reconnaître leur origine et de borner approximativement le TMC. Suite à des expériences de conjugaison, des transconjugants doubles résistants résultant *de facto* du transfert d'un marqueur physiquement non associé à l'AICE seront sélectionnés et leurs génomes reséquencés (figure 16).

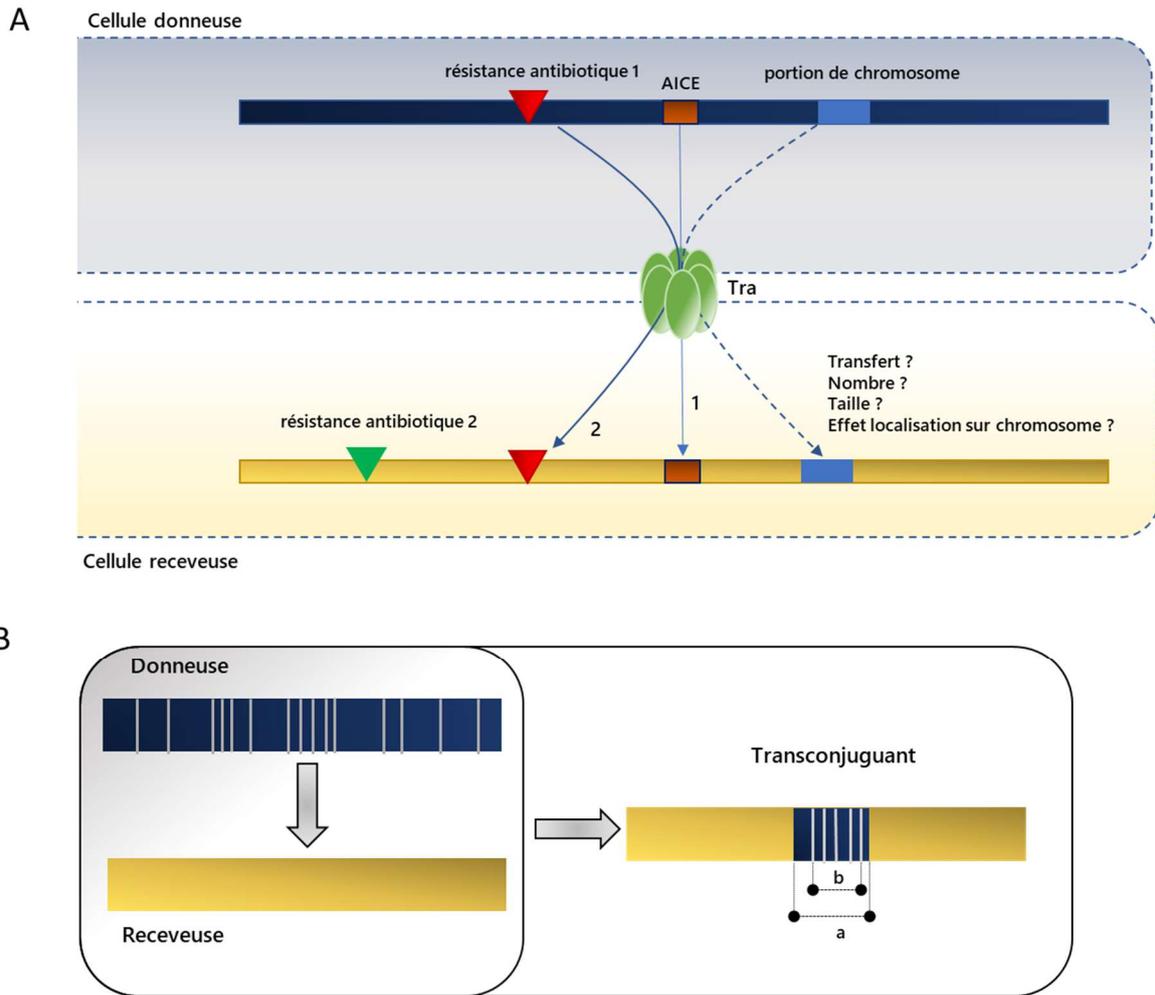


Figure 16. Design expérimental pour identifier du TMC entre souches. **A)** Dans le chromosome (rectangle bleu) de la cellule donatrice d'un AICE (rectangle brun), une cassette de résistance à un antibiotique (triangle rouge) a été insérée. La conjugaison est effectuée avec une cellule réceptrice marquée dans son chromosome (rectangle jaune) par un marqueur antibiotique (triangle vert) différent de la souche donatrice. Suite au transfert de l'AICE par la protéine Tra (événement 1), les transconjugants ayant acquis par TMC la résistance à l'antibiotique de la donatrice (événement 2) sont sélectionnés par la double résistance aux antibiotiques. Le séquençage de ces transconjugants permettra de savoir combien de marqueurs chromosomiques sont passés en *trans*, quelle est leur taille et si des positions sur le chromosome sont plus recombinogènes. **B)** Schéma de la stratégie d'identification de marqueurs chromosomiques de la donatrice chez les transconjugants après séquençage. La partie gauche représente les SNP (traits verticaux) dans le chromosome de la cellule donatrice (rectangle bleu) par rapport au chromosome de la réceptrice. Hormis ces SNP les séquences des deux chromosomes sont identiques. La partie droite montre le chromosome du transconjugant suite au transfert d'une portion d'ADN de la donatrice vers la réceptrice. La portion « a » représente la taille réelle de l'ADN transféré et la portion « b » la taille qui pourra être détectée par l'identification des SNP propres à l'ADN de la donatrice chez le

L'analyse par génomique comparative permettra par la suite de déterminer si d'autres fragments d'ADN ont été transférés et ainsi d'estimer l'ampleur réel des flux de gènes chez les *Streptomyces*. Les gènes marqueurs ont également été introduits à différents endroits le long du chromosome, ce qui permettra de tester si différents compartiments du chromosome (région core, bras...) sont plus transférés et/ou plus recombinogènes. L'analyse de ces transconjugants permettra pour la première fois d'estimer la

réelle ampleur des transferts de gènes chez les *Streptomyces*. Si ces derniers sont déjà reconnus comme étant recombinogènes, ceci ne pourrait être que le sommet de l'iceberg. En effet, des premiers résultats ont suggéré que le TMC d'un locus s'opérerait à une fréquence de 10^{-5} chez nos souches. Cette fréquence relativement élevée, si elle s'avère couplée à de multiples transferts et concerne des fragments d'ADN de grandes tailles pourrait conduire à une dynamique chromosomique aussi importante que celle observée chez les mycobacteria et la création de chromosomes chimères chez les *Streptomyces* serait dans ce cas envisageable.

Ce projet, déjà initié dans le cadre de la thèse de Caroline Choufa (co-dirigée avec Pierre Leblond) a permis de créer une nouvelle collaboration internationale avec Michiel Vos (Université d'Exeter), expert en génomique des populations et des analyses fonctionnelles sur des populations bactériennes isolées à petite échelle.

3. **Vers une meilleure compréhension des populations par analyse génomique**

3.1 Concept de population bactérienne

Conceptuellement, la population peut être définie comme les membres d'une même espèce qui coexistent et qui sont isolés reproductivement des autres membres de l'espèce. Du point de vue génomique, on peut donc voir l'espèce comme une unité de flux de gènes et la population comme une discontinuité dans ce flux (Arevalo et al., 2019). Cet isolement génétique peut permettre de circonscrire et de propager des changements adaptatifs chez des individus qui coexistent sous les mêmes pressions de sélection. Ces derniers vont donc présenter également une certaine cohérence au niveau écologique avec des fonctions communes. Le chevauchement de ces unités écologiques et génétiques vont constituer *in fine* les populations (Shapiro et al., 2012). La définition des populations est importante pour proposer des théories en écologie et en évolution. C'est en effet à cette échelle que se font les interactions entre individus et leurs environnements biotique et abiotique.

Pour les bactéries, définir des populations est donc important pour identifier leurs rôles dans l'environnement et avec leurs hôtes potentiels. En absence de sexualité, c'est également à cette échelle que les transferts de gènes, moteur important de leur évolution qui requiert la plupart du temps un contact physique, peuvent s'opérer le plus favorablement. Ce dernier point est important car il a été montré que les gènes adaptatifs permettant l'émergence de populations sont souvent acquis par transfert horizontal et généralement depuis un temps court (Arevalo et al., 2019). Une population bactérienne va ainsi se différencier d'une autre par la présence de gènes ou d'allèles spécifiques permettant son adaptation aux pressions de sélection de l'environnement (Cordero et al., 2012b; Hehemann et al., 2016; VanInsberghe et al., 2020). L'analyse du taux de recombinaison des génomes, l'étude de gènes évoluant rapidement (transfert ou évolution de fonction) et l'identification de gènes adaptatifs apparaissent donc comme des clés pour une meilleure définition de la population bactérienne, et pour en expliquer la genèse et le fonctionnement.

Dans mes recherches futures, j'aimerais donc aller vers une analyse plus fine de notre population au niveau génomique afin de mieux la caractériser et comprendre les mécanismes évolutifs qui sous-tendent sa création et son évolution. Une première analyse du taux de recombinaison de 5 gènes de ménage réalisée avec ClonalFrame (Didelot and Falush, 2007) a montré que dans notre collection de souches, celles isolées au contact de la racine avaient un taux de recombinaison 4 fois supérieur à celles

isolées quelques cm plus loin, dans un sol potentiellement en dehors de l'influence de la plante. Cette analyse préliminaire soulève des questions sur notre collection. Sommes-nous en présence d'une ou plusieurs populations ? Quelles sont les pressions de sélection existantes ? Quelle est l'influence de cette sélection sur la vitesse d'évolution, les transferts de gènes et la différenciation écologique des souches ? Existe-t-il une sélection de gènes et fonctions adaptatives à proximité de la rhizosphère ou dans le sol ? Dans notre contexte expérimental, si la plante apparaît comme un facteur écologique important à tester, un second facteur intuitivement identifiable est la production de métabolites spécialisés par les *Streptomyces* car elle régit un grand nombre d'interactions entre microbes ou avec la plante. Expérimentalement, le phénotype des MS est mesurable et quantifiable, permettant une corrélation à des traits écologiques. Les BGC étant prompts à se disperser, divers et évoluant vite (Fischbach et al., 2008), ils apparaissent donc comme de bons marqueurs des phénomènes écologiques et évolutifs rapides se déroulant dans une population.

3.2 Analyse génomique des populations sans *a priori*.

Concernant les populations bactériennes, au contraire des plantes et des animaux, il est souvent difficile d'établir une correspondance forte entre génétique et écologie. Pour définir une unité écologique, c'est-à-dire un groupe d'organismes avec des fonctions écologiques communes, le microbiologiste va généralement définir des critères jugés importants et quantifiables (assimilation de composés, résistance antibiotique, interaction avec un hôte...). Il va ensuite essayer de les faire correspondre sur des unités génétiques prédéfinies. Toutefois cette approche par *a priori* peut présenter des biais en occultant certaines fonctions ou en mettant trop de poids sur d'autres. Si l'unité génétique peut apparaître plus simple à quantifier par des approches d'analyse de séquences (ANI, MLST...) la notion de seuil pour définir les unités peut également être soumise à questionnement. Enfin, la notion de biogéographie, difficile à appréhender pour les bactéries trouble aussi les contours des populations. Toutefois de plus en plus d'études ont permis de circonscrire des populations, parfois différenciées depuis très peu de temps par génomique comparative (Cadillo-Quiroz et al., 2012; Shapiro et al., 2012; Kashtan et al., 2014). Pour ce faire, les échantillonnages sont réalisés à petite échelle afin de minimiser les effets biogéographiques et les divergences allopatriques, permettant d'identifier plus formellement les effets de la sélection et de la recombinaison. Les populations étant constituées de souches plus apparentées que certains seuils traditionnels (comme la proximité en séquence du gène codant l'ARNr 16S), les relations phylogénétiques sont établies après séquençage sur l'ensemble du core génome entre des souches taxonomiquement très proches. Si les groupements génétiques ainsi définis peuvent être comparés avec des fonctions écologiques déjà connues, ceci suggèrera que des unités cohérentes au niveau génétiques et écologiques (populations) se sont formées. S'il n'y a en revanche pas de regroupement, cela suggèrera que l'échantillonnage est constitué d'une seule population phénotypiquement hétérogène. Dans le cas où aucune fonction écologique n'est présupposée au départ, des approches sans *a priori* peuvent être réalisés. Des regroupements phylogénétiques forts et distincts, suggérant une différenciation stable, pourront ainsi être testés pour voir s'ils présentent des fonctions ou des niches particulières et constituent différentes populations.

Jusqu'à présent des analyses préliminaires de nos 11 souches ne suggèrent pas une différenciation particulière entre les souches isolées de la rhizosphère ou du sol, avec notamment un mélange de ces dernières dans les phylogénies obtenues sur leur core génome (données non montrées). Si ces premiers résultats suggèrent que nous sommes en présence d'une seule population non différenciée par la présence de la plante, il reste une certaine incertitude au niveau phylogénétique où certaines branches de l'arbre sont statistiquement mal supportées. Une nouvelle méthode développée récemment :

PopCOGenet permettrait d'affiner ces résultats (Arevalo et al., 2019). PopCOGenT mesure les flux de gènes récents entre des génomes étroitement apparentés et propose sur cette base une définition des populations. Brièvement, un événement de transfert a pour conséquence la présence d'une portion de génome partagée dont la séquence est identique chez les deux souches ayant échangé. Plus les transferts sont fréquents et importants (en termes de longueur des fragments d'ADN), plus la quantité d'ADN de séquence identique partagée sera importante. En revanche, suite au transfert, l'accumulation de mutations dans le temps va contrer l'impact du transfert horizontal en érodant progressivement ces régions synténiques au cours du temps. Dans PopCOGenT, une simulation du phénomène d'accumulation de mutation est effectuée dans le cas d'une reproduction clonale stricte de la population, c'est-à-dire ne faisant pas intervenir du transfert de gène. La distribution des SNP des souches comparées deux à deux est ensuite comparée à ce modèle prédictif pour identifier gènes échangés récemment et caractérisés par un nombre moindre de SNP. Cette approche permet *in fine* de créer des clusters de souches cohérents. Elle a également l'avantage d'identifier les gènes adaptatifs au sein d'une population. Du fait de leur transfert entre souches et de leur fixation dans la population, ces derniers seront caractérisés par une diversité de séquence moindre entre eux que celle observée au niveau de la population (figure 17).

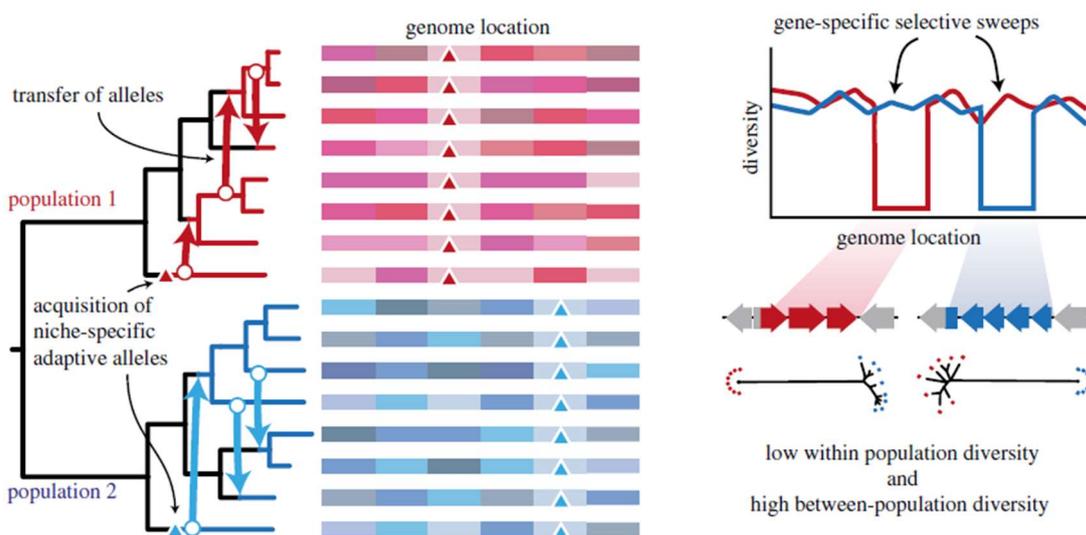


Figure 17 : **Identification par génomique comparative de gènes à valeur adaptative entre deux populations.**

Les populations représentent des unités fondamentales à travers lesquelles des traits adaptatifs et se propagent. Lorsqu'une population acquiert des allèles (soit par mutation *de novo*, soit par acquisition horizontale), ces allèles peuvent être transférés à d'autres membres de la même population par recombinaison homologue. Si ces traits apportent un avantage spécifique à une niche, ils pourront se fixer dans la population par sélection. Par conséquent, l'une des caractéristiques de ces régions, lorsqu'on compare les génomes, est la diminution locale de la diversité nucléotidique au niveau des loci transférés. L'observation de ces régions qui ont subi des sweep sélectifs récents est une confirmation que la structure de population prédite est biologiquement significative. Adapté de Valnsberghe et al. 2020

Le développement de ces pipelines bio-informatiques pourrait donc nous permettre de caractériser sans *a priori* nos populations et identifier potentiellement des gènes adaptatifs en rapport avec leur contexte écologique. Si notre échantillonnage actuel se révèle effectivement non différencié, ces approches pourront être étendues à plus de souches, voire à d'autres collections existantes au laboratoire, qui ont été construites dans l'idée d'avoir des échantillonnages plus représentatifs de la diversité de différents compartiments rhizosphériques. L'expérience acquise dans la création, le séquençage et l'analyse de populations naturelles nous permettra également de créer de nouvelles collections en rapport avec des questions biologiques nouvelles. La maîtrise des outils bio-informatiques va en revanche requérir une montée en compétence ou au travers de collaborations. Dans ce sens, une collaboration vient d'être initiée récemment avec Olivier Lespinet de l'I2BC à Paris Saclay pour commencer à s'approprier ces pipelines.

3.3 Analyse de BGC comme points chauds de recombinaison.

Dans l'environnement, les caractéristiques des métabolites secondaires font d'eux des acteurs importants lors d'interactions que ce soit comme molécules signal, de communication ou comme inhibiteurs de croissance de compétiteurs. En revanche, l'absence d'une conservation forte des gènes les codant dans les génomes au niveau de l'espèce indique qu'ils n'apportent pas au final un avantage sélectif fort à cette échelle et que les MS participent plutôt une adaptation spécifique à différentes niches (Jensen, 2016). Or, si un MS apporte un avantage sélectif nouveau à certaines souches (colonisation d'une nouvelle niche, inhibition des autres membres de la population...), il pourra leur permettre de diverger des autres membres de la population. Les MS peuvent donc représenter des fonctions écologiques clés qui permettraient de définir des écotypes (Jensen, 2016). Par extension, la diversification des BGC (par acquisition ou par modification) les codant serviraient de moteur à la diversification des bactéries. Pour l'acquisition, le fait que les BGC sont regroupés en îlots génomiques de plusieurs dizaines de gènes et sont souvent associés à des éléments génétiques mobiles indique qu'ils sont fréquemment transférés horizontalement (Fischbach et al., 2008). Leur présence à des positions similaires dans les régions variables du chromosome (comme observé chez *Salinispora* (Ziemert et al., 2014) ou chez nos souches (Tidjani et al., 2019b) permettrait de plus d'atténuer le coût de leur acquisition (Jensen, 2016). Ainsi, lors des thèses de R. Tidjani et M. Nicault, nous avons pu voir que les souches d'une même population possédaient à la fois un corpus de BGC communs, mais également des BGC variables entre souches sœurs. Cette observation a également été faite dans d'autres populations d'actinomycètes comme *Salinispora* (Ziemert et al., 2014). Corrélée avec un temps évolutif plus long, l'ampleur de ce phénomène est logiquement plus importante dans des niveaux taxonomiques supérieurs comme l'espèce ou le genre. Ainsi, seuls quelques rares MS tels que l'ectoïne, des pigments de spores, certains sidérophores et la molécule volatile géosmine semblent largement partagés au sein du genre *Streptomyces* (Vicente et al., 2018). Dans cette perspective, les BGC peuvent être vus comme des « kits génétiques », prêts à l'emploi et prompts à être transférés entre souches proches pour permettre leur adaptation rapide à des conditions variables de l'environnement. Concernant l'évolution des BGC, elle peut se faire par mutation, recombinaison, perte ou gain de gènes ou fusion de clusters ((Fischbach et al., 2008; Jenke-Kodama and Dittmann, 2009). Leur structure modulaire permettrait une évolution rapide par modifications génétiques, notamment exploitée en biologie synthétique pour créer de nouvelles molécules.

Des analyses de génomique comparative vont également dans le sens d'un dynamisme génétique fort des BGC de nos souches, car nous avons pu observer que les voies de biosynthèse communes différaient par divers événements de réarrangements (figure 18). Les BGC apparaissent donc comme de très bons marqueurs dans notre contexte d'étude en étant à la fois des régions génomiques prompts à évoluer et permettant d'avoir une réponse adaptative directe, donc de faire un lien entre population, écologie et évolution sur des temps courts.

L'objectif sera donc dans un premier temps de caractériser de façon exhaustive les événements de recombinaison entre voies de biosynthèse présentes dans toute (conservées) ou partie (variables) de la population. En comparant leur taux d'évolution, que ce soit en terme d'indels ou de séquence (SNP, mesure dN/dS) avec d'autres catégories de gènes (ex. gènes du core génome) nous tenterons de savoir si les BGC sont des points chauds de recombinaison, évoluant plus vite que le reste du génome. Si ces mécanismes favorisent l'émergence de métabolites nouveaux ils pourraient être à l'origine d'adaptations rapides aux changements environnementaux (compétition biotique ou changements abiotiques). Cette meilleure compréhension de l'évolution des BGC permettra de comprendre leur rôle écologique, et potentiellement apporter des questions concernant leur diversification. A quelle vitesse les BGC sont créés ou perdus ? A quelle fréquence de nouvelles molécules apparaissent ? Les BGC nouvellement créés produisent-ils des molécules fonctionnelles ? Comment sont sélectionnés les clusters de gènes nouvellement créés ?

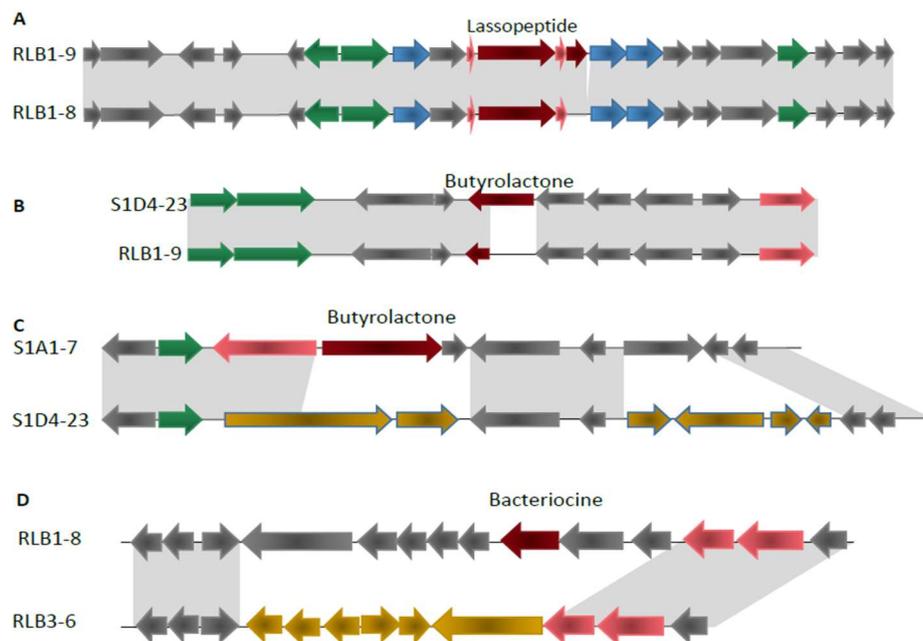


Figure 18 : Evolution des clusters de synthèse de métabolites secondaires suite à des événements de recombinaison. Les différentes flèches représentent les CDS (en gris foncé les CDS de fonction inconnues, en bleu les CDS participant au transport de la molécule synthétisée, en vert les gènes de régulation, en rouge les gènes cœur de synthèse du métabolite et en rose les gènes additionnels de synthèse de métabolites. Les régions en gris claire correspondent à la conservation de la synténie et en blanc la rupture de la synténie. **A.** Absence de prédiction d'un des gènes cœur de synthèse d'un lasso peptide dans la souche RLB1-8 suite à une recombinaison ayant fait disparaître le codon stop dudit gène. **B.** Le gène cœur de synthèse du butyrolactone a été tronqué suite à une recombinaison ayant introduit un stop prématuré dans la séquence dudit gène dans la souche RLB1-9. **C.** Délétion complète du gène cœur du butyrolactone suite à une recombinaison ayant entraîné le remplacement de ce gène par d'autres chez S1D4-23. **D.** remplacement du cluster de synthèse de la bactériocine suite à une recombinaison ayant entraîné la disparition de ce cluster de la souche RLB3-6.

4. Population et écologie : interconnexion entre population bactérienne et plante

Les résultats obtenus lors de la thèse de R. Tidjani ont suggéré que la diversité génétique observée à l'échelle d'une population de *Streptomyces* pouvait être le support d'une diversité fonctionnelle entre souches. Quel est toutefois l'impact de cette variabilité sur le fonctionnement de la population ? De manière simplifiée, dans le cas où la fonction variable n'est pas neutre dans l'environnement considéré, deux conséquences peuvent être anticipées pour les souches possédant cette fonction. La première est la sélection positive des variants si la fonction est bénéfique. La seconde est à l'inverse leur contre-sélection si la fonction est délétère. Cette réflexion au niveau de la souche peut être toutefois pondérée à l'échelle de la population car ces fonctions variables peuvent servir de biens communs, c'est-à-dire également profiter aux souches non productrices. Par extension à nos résultats, j'aimerais cerner le rôle synergique des populations bactériennes en tant qu'unité écologique et, notre population étant isolée de la rhizosphère d'un hêtre, prendre comme contexte les relations plante-microbiote.

En effet, à l'instar du microbiote qui colonise le système digestif animal, la microflore du sol est de plus en plus considérée comme l'un des acteurs majeurs de la santé et de la résilience de l'écosystème forestier (Singh et al., 2015). A ce titre, les *Streptomyces* constituent un genre modèle du microbiote rhizosphérique. Elles sont ubiquistes dans les rhizosphères et leur rôle y est potentiellement important, notamment en y produisant des activités antibiotiques, antifongiques et insecticides, contribuant à établir des sols suppressifs (Chater, 2006; Nimaichand et al., 2015), c'est-à-dire un sol dans lequel une maladie d'origine fongique ou bactérienne est inhibée ou limitée dans son incidence. Les *Streptomyces* sont également capables de promouvoir directement la croissance des plantes (Lehr et al., 2007, 2008; Schrey and Tarkka, 2008) par la production d'auxine, de cytokines ou la dégradation de précurseurs de l'éthylène (Joshi and Loria, 2007; Palaniyandi et al., 2013, 2014). Des promotions indirectes de la croissance peuvent également se produire via la solubilisation de phosphate, l'acquisition de fer et l'oxydation de sulfure (Grayston and J. Germida, 2011; Marschner et al., 2011; Uroz et al., 2011; Bulgarelli et al., 2012). Toutefois ces fonctions sont vues par le prisme de souches uniques. Nous poserons donc la question de savoir si grâce à des interactions synergiques, une population peut mieux performer pour l'établissement d'une fonction biologique que les individus pris séparément. Il est par exemple possible que des enzymes ou biomolécules cryptiques puissent être régulées et exprimées différemment en population. Des effets doses de production sont également envisageables.

Un des premiers objectifs sera donc de voir quels sont les **avantages de la mixité d'une population bactérienne pour son interaction avec les plantes**. Afin de répondre à cette question, nous pourrions tirer profit de notre collection de souches et simuler dans une approche ascendante (bottom-up) des situations plus ou moins complexes de mélanges de souches. Ces mélanges seront ensuite comparés aux souches seules pour les fonctions envisagées en termes d'induction et/ou d'intensité. Une grande partie de ces tests (solubilisation de minéraux, production de sidérophores, l'inhibition de phytopathogènes) ont l'avantage de pouvoir être réalisés sur boîte dans des conditions contrôlables et semi-quantifiables (figure 19). Afin d'avoir une vision plus intégrée du fonctionnement global des bactéries avec un hôte, **l'influence de la plante sur la diversité de son microbiote** pourra être étudiée. Cela permettra de voir par exemple si la rhizosphère constitue un micro-environnement stimulant l'évolution du microbiote racinaire et l'émergence de populations fonctionnellement plus diverses et potentiellement plus efficaces pour interagir avec la plante et les autres partenaires de la rhizosphère. Ainsi, il a déjà été démontré que la rhizosphère permettait d'augmenter la fréquence de transfert de plasmides conjugatifs (Aminov, 2011a), mais jamais sur des populations naturelles. Afin de répondre à cette question, nous utiliserons une nouvelle fois notre population de *Streptomyces* afin notamment de voir si la plante peut promouvoir le transfert d'éléments génétiques mobiles. Pratiquement, la présence

d'une plante pourra être simulée en inoculant des boîtes de Pétri avec des exsudats ou des composés caractéristiques de la rhizosphère (sucres, flavonoïdes...). Afin d'estimer le flux de gènes, nous pourrions notamment tirer avantage de la capacité des *Streptomyces* à former des pocks lors de certains transferts conjugatifs.

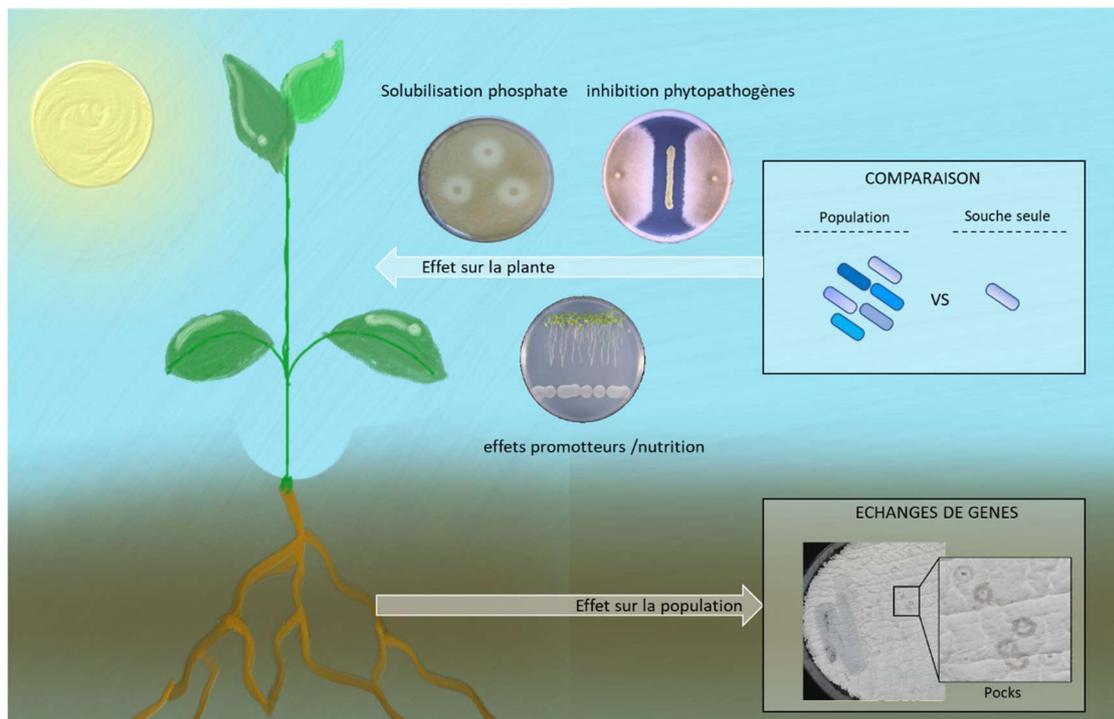


Figure 19 : Schématisation des expériences d'interconnexion entre plante et populations bactériennes. Dans ces expériences des mélanges de souches plus ou moins complexes seront comparés aux souches seules prises indépendamment (cadre supérieur droit) pour des tests PGPR indirects sur boîte ou directement en interaction avec la plante (solubilisation de composés, inhibition de pathogènes, croissance racinaire...). L'effet de la plante sera en retour testé (directement ou indirectement par l'adjonction d'exsudats racinaires) sur les populations bactériennes comme notamment pour le transfert de gènes visualisé par la formation de pocks (cadre inférieur droit). Crédits photos www.biofertilisants.fr ; Zamiodis et al. ; Thoma et al ; Gabrielle Bontemps.

L'ensemble de ce projet nous permettra de répondre à plusieurs questions en front de science sur le fonctionnement de la rhizosphère. Premièrement, quel est le rôle de la diversité intra-populationnelle et quels en sont les avantages pour la population, la communauté microbienne et au final pour la plante ? Deuxièmement, est-ce que la rhizosphère stimule les transferts de gènes et permet de maintenir un degré de variabilité fonctionnelle au niveau de la population ? Pour ce projet, des contacts pour des collaborations avec Claire Fourrey de l'INRA, la société PAT pour la production d'exsudats ont été initiés.

5. Evolution expérimentale de populations de *Streptomyces*

Différents aspects de ce projet de recherche, notamment sur la vitesse, l'ampleur de la diversification génétique d'une population et sur ses conséquences fonctionnelles pourront être confrontés et affinés au travers d'expériences d'évolution expérimentale. Ce type d'approche a été initié pour la première fois dans les années 1990, par Richard Lenski (Université du Michigan, États-Unis) en repiquant quotidiennement des cultures d'*E. coli*. Cette expérience fondatrice d'évolution à long terme, qui se poursuit encore aujourd'hui (73 500 générations en 2020) a ouvert la voie à de nombreuses autres expériences de ce type en microbiologie (Van den Bergh et al., 2018). En effet, les bactéries sont d'excellentes candidates pour ces approches grâce à des temps de générations courts, des effectifs de populations importants autorisant la coexistence de plusieurs génotypes et une relative simplicité de manipulation permettant leur reconnaissance, typage et conservation par congélation. L'apport de la génomique pour comparer les souches évoluées entre elles ou avec les souches ancestrales permet également de révéler les mécanismes génétiques intervenant dans les processus adaptatifs.

Les premières expériences d'évolution expérimentales possédaient un degré de complexité relativement simple (une souche cultivée dans un milieu synthétique constant) et ont permis de tester des théories en évolution, comme par exemple comprendre les processus d'évolution par la sélection naturelle (Baym et al., 2016), l'émergence de variants généralistes ou spécialisés (Kram et al., 2017) et comment la diversité peut se créer et se maintenir (Tenailon et al., 2016; Couce et al., 2017; McDonald, 2019). Actuellement, de plus en plus d'études tendent à complexifier les conditions de culture pour mieux rendre compte des réalités et contraintes écologiques que rencontrent les bactéries dans leurs environnements naturels (Manriquez et al., 2021). Par exemple, des expériences ont été réalisées en utilisant des milieux complexes ou fluctuants (Barrett et al., 2005), des communautés bactériennes naturelles ou reconstruites (Cairns et al., 2018; Scheuerl et al., 2020), en interaction avec une plante (Marchetti et al., 2010; Guidot et al., 2014). Ces travaux ont permis d'éclaircir le fonctionnement écologique des communautés bactériennes quant à leur adaptation à des conditions environnementales changeantes ou sur leurs interactions avec un hôte ou entre elles.

Si un nombre croissant d'expériences évolution expérimentale ont été réalisées (plus de 600 sont recensées sur la base de données CAMEL (<https://camelatabase.com/#!/experiments>) (Van den Bergh et al., 2018), peu d'études utilisent encore des communautés ou des populations naturelles évoluant avec ou sans pression de sélection. De même peu d'études ont pris en compte les transferts de gènes qui restent des mécanismes évolutifs clés de l'évolution bactérienne (Chu et al., 2018; Maddamsetti and Lenski, 2018; Slomka et al., 2020; Power et al., 2021). C'est pourquoi nous aimerions développer ici la première expérience d'évolution expérimentale basée sur une population naturelle de *Streptomyces* évoluant ou non sous pression (e.g. d'une plante) afin d'estimer le flux de transfert de gène y existant ainsi que leurs conséquences.

Le dispositif expérimental sera relativement simple techniquement (même s'il peut s'avérer contraignant pratiquement) et consistera à co-cultiver ensemble différentes souches de notre population sur boîte durant un cycle de sporulation (environ une vingtaine de générations) et à les repiquer toutes les semaines (figure 20).

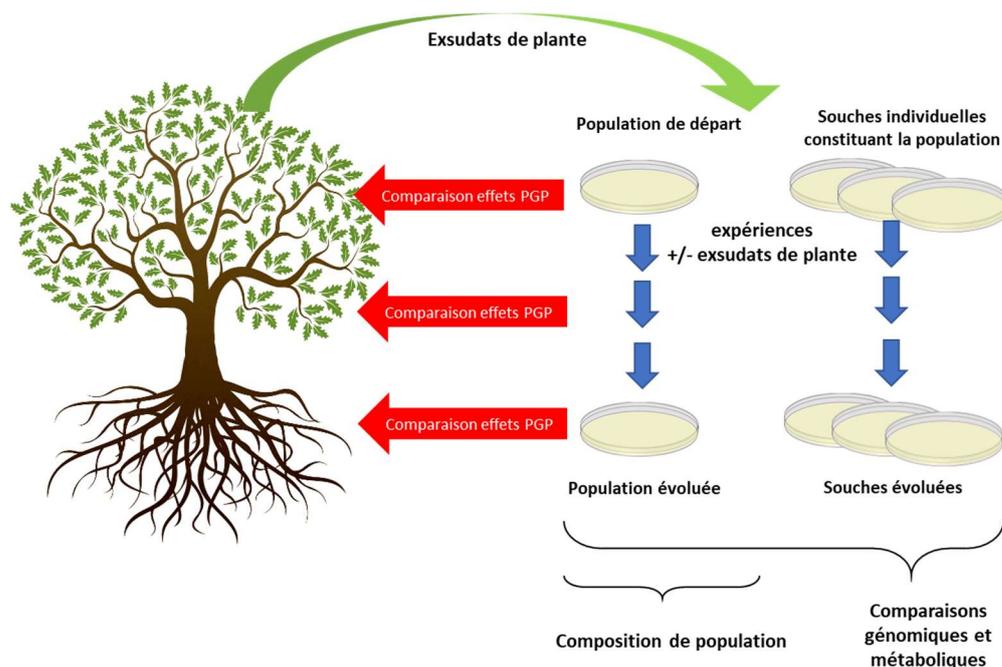


Figure 20 : Exemple de design d'une expérience d'évolution expérimentale pour monitorer l'effet de sélection d'une plante sur une population de *Streptomyces*. Plusieurs répliques individuelles seront faites pour les expériences avec des populations et pour chaque souche seule. Chaque semaine, les spores de chaque boîte seront collectées, diluées en série et ré-étalées. Les stocks de spores seront conservés dans du glycérol à -80°C chaque semaine pour un accès ultérieur. A plusieurs moments sur une période de 34 semaines (représentés sur la barre grise comme une séquence de Fibonacci), des tests PGP, une analyse de la composition des populations et des comparaisons métaboliques

Ce type d'approche permettra de voir dans un premier temps comment une population évolue en termes de composition au fil des repiquages. Des souches prennent-elles le pas sur les autres ou un équilibre existe-t-il toujours au fil des générations ? La réponse à ce type de question pourra notamment être apportée par des approches de quantification des différentes souches par qPCR au cours du temps. Nos souches étant capables d'échanger des AICE, mais également des marqueurs chromosomiques, les génomes seront ensuite reséquencés à différents pas de temps pour visualiser les modifications génomiques ayant eu lieu, ce qui permettra de quantifier le flux réel de gènes se produisant entre ces souches.

Ce type de questionnement pourra être étendu à la présence d'une plante comme pression de sélection, dont la présence pourra être simulée par l'adjonction d'exsudats racinaires dans le milieu de culture. Nous pourrions ainsi voir si la plante peut sélectionner des individus plus adaptés au sein de la population. Cette échelle de sélection sera novatrice car s'il est établi que la plante sélectionne et favorise certains groupes de micro-organismes du sol au niveau de la communauté (Hassani et al., 2018), cette question n'a jamais été abordée au niveau de la population - les approches couramment utilisées (par exemple la métagénomique) ne donnant pas de résultats à ce niveau taxonomique. En comparant les souches des populations de départ et celles évoluées, nous pourrions également voir si la réponse physiologique (tests PGP pour Plant Growth Promotion) a pu être modifiée sous pression de la plante.

Au niveau des flux de gènes, si la rhizosphère peut influencer le transfert de plasmides (Aminov, 2011b), nous pourrions ici voir son influence sur le transfert d'AICE et le TMC en comparant les populations ayant évolué ou non en sous influence de la plante. La forte évolutivité de nos souches et leur proximité taxonomique n'étant pas un frein à la recombinaison, il devrait également permettre un mélange de gènes important permettant probablement d'obtenir des résultats sur des temps relativement courts (par ex. quelques mois) et potentiellement de voir quels gènes pourraient être sous la pression de sélection de la plante. L'ensemble de ces résultats permettra de mieux comprendre le fonctionnement de la rhizosphère, les influences réciproques entre la plante et son microbiote et si l'évolution génomique est compatible avec une adaptation rapide aux changements environnementaux.

6. Conclusion du projet

L'évolution est souvent vue et étudiée sur des temps longs, voire géologiques. Toutefois, les phénomènes observés à ces échelles sont la résultante de l'ensemble des événements se produisant à petite échelle et sur des temps courts. L'intégration de différentes échelles de temps est donc importante pour mieux comprendre l'ensemble des phénomènes évolutifs. C'est pourquoi l'étude des populations est primordiale car elle permet de voir les phénomènes évolutifs dans ses premières occurrences. Si nos premières études sur une population de *Streptomyces* ont permis de montrer que les phénomènes évolutifs étaient déjà massifs et rapides à cette échelle, il se pose maintenant la question de savoir comment cette diversité se crée, comment elle est sélectionnée et comment elle sert et prend parti intégrante au fonctionnement de la population. Comme exposé précédemment, afin de répondre à ces questions, ce projet de recherche s'appuiera sur l'intégration d'approches en génomique, écologie et génétique. Toutefois, chaque partie visera à répondre à ses propres questions et pourra se réaliser indépendamment à différents pas de temps. A court terme certaines parties sont déjà initiées comme le TMC dans le cadre de la thèse de Caroline Choufa et d'autres sont en cours d'élaboration.

Ce projet a donc une vocation principalement fondamentale, mais des apports appliqués pourront en découler comme la découverte de biomolécules ou la création de cocktails de souches avec des effets PGP. Certaines parties pourront nécessiter de la recherche de compétences supplémentaires dans le cadre de collaborations nouvelles ou déjà établies. Cela aura pour intérêt de créer et de renforcer des réseaux scientifiques à la fois au niveau local, national et international. Au niveau local, il permettra notamment un rapprochement avec l'INRAE de Champenoux (spécialiste des interactions plantes-microorganismes) et une insertion plus forte dans le cadre du LABEX ARBRE (<https://mycor.nancy.inra.fr/ARBRE/>). Un rapprochement avec le laboratoire LCP-A2MC de l'Université de Lorraine à Metz (Patrick Chaimbault, spécialiste en biochimie) a également été entrepris sur des questions métabolomiques dans le cadre du projet biomolécule 4.0 du LUE. Au niveau national, un rapprochement avec Dominique Schneider (Université Grenoble Alpes) spécialiste d'évolution dirigée et d'équipes de l'IBBC Paris Saclay qui travaillent sur l'évolution génomique des *Streptomyces* (Jean-luc Pernodet et Stéphanie Bury Monet) ou en bio-informatique (Olivier Lespinet) sont initiées ou pourront l'être. Au niveau international, une collaboration avec Michiel Vos (Université d'Exeter, GB) est déjà initiée, mais une recherche d'autres partenaires spécialistes de l'évolution des BGC des actinomycètes (par exemple Paul Jensen, San Diego, USA) ou des interactions écologiques entre *Streptomyces* (Daniel Rozen, Leiden, Pays-Bas) pourront être envisagées.

Bibliographie

Bibliographie

- Aigle, B., and Corre, C. (2012). Waking up *Streptomyces* secondary metabolism by constitutive expression of activators or genetic disruption of repressors. *Methods Enzymol* 517, 343–366. doi:10.1016/B978-0-12-404634-4.00017-6.
- Amadou, C., Pascal, G., Mangenot, S., Glew, M., Bontemps, C., Capela, D., et al. (2008). Genome sequence of the beta-rhizobium *Cupriavidus taiwanensis* and comparative genomics of rhizobia. *Genome Res* 18, 1472–1483. doi:10.1101/gr.076448.108.
- Aminov, R. I. (2011a). Horizontal Gene Exchange in Environmental Microbiota. *Front. Microbiol.* 2. doi:10.3389/fmicb.2011.00158.
- Arevalo, P., VanInsberghe, D., Elsherbini, J., Gore, J., and Polz, M. F. (2019). A Reverse Ecology Approach Based on a Biological Definition of Microbial Populations. *Cell* 178, 820-834.e14. doi:10.1016/j.cell.2019.06.033.
- Barka, E. A., Vatsa, P., Sanchez, L., Gaveau-Vaillant, N., Jacquard, C., Meier-Kolthoff, J. P., et al. (2016). Taxonomy, Physiology, and Natural Products of Actinobacteria. *Microbiol Mol Biol Rev* 80, 1–43. doi:10.1128/MMBR.00019-15.
- Barrett, R. D. H., MacLean, R. C., and Bell, G. (2005). Experimental evolution of *Pseudomonas fluorescens* in simple and complex environments. *Am Nat* 166, 470–480. doi:10.1086/444440.
- Baym, M., Lieberman, T. D., Kelsic, E. D., Chait, R., Gross, R., Yelin, I., et al. (2016). Spatiotemporal microbial evolution on antibiotic landscapes. *Science* 353, 1147–1151. doi:10.1126/science.aag0822.
- Bellanger, X., Morel, C., Gonot, F., Puymege, A., Decaris, B., and Guédon, G. (2011). Site-specific accretion of an integrative conjugative element together with a related genomic island leads to cis mobilization and gene capture. *Mol Microbiol* 81, 912–925. doi:10.1111/j.1365-2958.2011.07737.x.
- Blesa, A., Baquedano, I., Quintáns, N. G., Mata, C. P., Castón, J. R., and Berenguer, J. (2017). The transjugation machinery of *Thermus thermophilus*: Identification of TdtA, an ATPase involved in DNA donation. *PLoS Genet* 13, e1006669. doi:10.1371/journal.pgen.1006669.
- Blin, K., Shaw, S., Steinke, K., Villebro, R., Ziemert, N., Lee, S. Y., et al. (2019). antiSMASH 5.0: updates to the secondary metabolite genome mining pipeline. *Nucleic Acids Res* 47, W81–W87. doi:10.1093/nar/gkz310.
- Boivin-Masson, C., Bontemps, C., Golfier, G., Gris-Liebe, C., and Talini, L. (2006). Détection et typage du gène à l'aide de biopuces à ADN: perspectives pour l'étude de la diversité et de l'écologie moléculaire des rhizobia. *Les Actes du BRG* 6, 97–110.
- Bontemps, C., Elliott, G. N., Simon, M. F., Dos Reis Júnior, F. B., Gross, E., Lawton, R. C., et al. (2010a). Burkholderia species are ancient symbionts of legumes. *Mol Ecol* 19, 44–52. doi:10.1111/j.1365-294X.2009.04458.x.
- Bontemps, C., Golfier, G., Gris-Liebe, C., Carrere, S., Talini, L., and Boivin-Masson, C. (2005). Microarray-based detection and typing of the *Rhizobium* nodulation gene *nodC*: potential of DNA arrays to diagnose biological functions of interest. *Appl Environ Microbiol* 71, 8042–8048. doi:10.1128/AEM.71.12.8042-8048.2005.
- Bontemps, C., Rogel, M. A., Wiechmann, A., Mussabekova, A., Moody, S., Simon, M. F., et al. (2016). Endemic *Mimosa* species from Mexico prefer alphaproteobacterial rhizobial symbionts. *New Phytol* 209, 319–333. doi:10.1111/nph.13573.
- Bontemps, C., Toussaint, M., Revol, P.-V., Hotel, L., Jeanbille, M., Uroz, S., et al. (2013). Taxonomic and functional diversity of *Streptomyces* in a forest soil. *FEMS Microbiol Lett* 342, 157–167. doi:10.1111/1574-6968.12126.
- Bordeleau, E., Ghinet, M. G., and Burrus, V. (2012). Diversity of integrating conjugative elements in actinobacteria: Coexistence of two mechanistically different DNA-translocation systems. *Mob Genet Elements* 2, 119–124. doi:10.4161/mge.20498.
- Bornscheuer, U., Buchholz, K., and Seibel, J. (2014). Enzymatic degradation of (ligno)cellulose. *Angew Chem Int Ed Engl* 53, 10876–10893. doi:10.1002/anie.201309953.
- Bulgarelli, D., Rott, M., Schlaeppli, K., Ver Loren van Themaat, E., Ahmadinejad, N., Assenza, F., et al. (2012). Revealing structure and assembly cues for *Arabidopsis* root-inhabiting bacterial microbiota. *Nature* 488, 91–95. doi:10.1038/nature11336.
- Burke, J., Schneider, D., and Westpheling, J. (2001). Generalized transduction in *Streptomyces coelicolor*. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 98, 6289–6294. doi:10.1073/pnas.101589398.

- Cadillo-Quiroz, H., Didelot, X., Held, N. L., Herrera, A., Darling, A., Reno, M. L., et al. (2012). Patterns of gene flow define species of thermophilic Archaea. *PLoS Biol* 10, e1001265. doi:10.1371/journal.pbio.1001265.
- Cairns, J., Jokela, R., Hultman, J., Tamminen, M., Virta, M., and Hiltunen, T. (2018). Construction and Characterization of Synthetic Bacterial Community for Experimental Ecology and Evolution. *Front Genet* 9, 312. doi:10.3389/fgene.2018.00312.
- Casjens, S., and Huang, W. M. (1993). Linear chromosomal physical and genetic map of *Borrelia burgdorferi*, the Lyme disease agent. *Mol Microbiol* 8, 967–980. doi:10.1111/j.1365-2958.1993.tb01641.x.
- Cassini, A., Högberg, L. D., Plachouras, D., Quattrocchi, A., Hoxha, A., Simonsen, G. S., et al. (2019). Attributable deaths and disability-adjusted life-years caused by infections with antibiotic-resistant bacteria in the EU and the European Economic Area in 2015: a population-level modelling analysis. *Lancet Infect Dis* 19, 56–66. doi:10.1016/S1473-3099(18)30605-4.
- Chang, P. C., and Cohen, S. N. (1994). Bidirectional replication from an internal origin in a linear *Streptomyces* plasmid. *Science* 265, 952–954. doi:10.1126/science.8052852.
- Chase, A. B., Sweeney, D., Muskat, M. N., Guillén-Matus, D. G., and Jensen, P. R. (2021). Vertical Inheritance Facilitates Interspecies Diversification in Biosynthetic Gene Clusters and Specialized Metabolites. *mBio* 12, e02700-21. doi:10.1128/mBio.02700-21.
- Chater, K. F. (2006). *Streptomyces* inside-out: a new perspective on the bacteria that provide us with antibiotics. *Philos. Trans. R. Soc. Lond., B, Biol. Sci.* 361, 761–768. doi:10.1098/rstb.2005.1758.
- Chen, W.-M., de Faria, S. M., Chou, J.-H., James, E. K., Elliott, G. N., Sprent, J. I., et al. (2008). *Burkholderia sabiae* sp. nov., isolated from root nodules of *Mimosa caesalpinifolia*. *Int J Syst Evol Microbiol* 58, 2174–2179. doi:10.1099/ijs.0.65816-0.
- Chen, W.-M., Moulin, L., Bontemps, C., Vandamme, P., Béna, G., and Boivin-Masson, C. (2003). Legume symbiotic nitrogen fixation by beta-proteobacteria is widespread in nature. *J Bacteriol* 185, 7266–7272. doi:10.1128/jb.185.24.7266-7272.2003.
- Chen, W.-M., Zhu, W.-F., Bontemps, C., Young, J. P. W., and Wei, G. H. (2010). *Mesorhizobium alhagi* sp. nov., isolated from wild *Alhagi sparsifolia* in north-western China. *Int J Syst Evol Microbiol* 60, 958–962. doi:10.1099/ijs.0.014043-0.
- Chen, W.-M., Zhu, W.-F., Bontemps, C., Young, J. P. W., and Wei, G.-H. (2011). *Mesorhizobium camelthorni* sp. nov., isolated from *Alhagi sparsifolia*. *Int J Syst Evol Microbiol* 61, 574–579. doi:10.1099/ijs.0.022947-0.
- Chong, C. S., Sabir, D. K., Lorenz, A., Bontemps, C., Andeer, P., Stahl, D. A., et al. (2014). Analysis of the xplAB-containing gene cluster involved in the bacterial degradation of the explosive hexahydro-1,3,5-trinitro-1,3,5-triazine. *Appl Environ Microbiol* 80, 6601–6610. doi:10.1128/AEM.01818-14.
- Choulet, F., Aigle, B., Gallois, A., Mangenot, S., Gerbaud, C., Truong, C., et al. (2006). Evolution of the terminal regions of the *Streptomyces* linear chromosome. *Mol Biol Evol* 23, 2361–2369. doi:10.1093/molbev/msl108.
- Chu, H. Y., Sprouffske, K., and Wagner, A. (2018). Assessing the benefits of horizontal gene transfer by laboratory evolution and genome sequencing. *BMC Evol Biol* 18, 54. doi:10.1186/s12862-018-1164-7.
- Colin, M., Charpentier, E., Klingelschmitt, F., Bontemps, C., Champs, C. D., Reffuveille, F., et al. (2020). Specific antibacterial activity of copper alloy touch surfaces in five long-term care facilities for older adults. *Journal of Hospital Infection* 104, 283–292. doi:10.1016/j.jhin.2019.11.021.
- Cordero, O. X., Ventouras, L.-A., DeLong, E. F., and Polz, M. F. (2012a). Public good dynamics drive evolution of iron acquisition strategies in natural bacterioplankton populations. *Proc Natl Acad Sci U S A* 109, 20059–20064. doi:10.1073/pnas.1213344109.
- Cordero, O. X., Wildschutte, H., Kirkup, B., Proehl, S., Ngo, L., Hussain, F., et al. (2012b). Ecological populations of bacteria act as socially cohesive units of antibiotic production and resistance. *Science* 337, 1228–1231. doi:10.1126/science.1219385.
- Couce, A., Caudwell, L. V., Feinauer, C., Hindré, T., Feugeas, J.-P., Weigt, M., et al. (2017). Mutator genomes decay, despite sustained fitness gains, in a long-term experiment with bacteria. *Proc Natl Acad Sci U S A* 114, E9026–E9035. doi:10.1073/pnas.1705887114.
- Degois, J., Clerc, F., Simon, X., Bontemps, C., Leblond, P., and Duquenne, P. (2017). First Metagenomic Survey of the Microbial Diversity in Bioaerosols Emitted in Waste Sorting Plants. *Ann Work Expo Health* 61, 1076–1086. doi:10.1093/annweh/wxx075.
- Degois, J., Simon, X., Bontemps, C., Leblond, P., and Duquenne, P. (2019). Characterization of experimental complex fungal bioaerosols: Impact of analytical method on fungal composition measurements. *Aerosol Science and Technology* 53, 146–159. doi:10.1080/02786826.2018.1557320.
- Didelot, X., and Falush, D. (2007). Inference of Bacterial Microevolution Using Multilocus Sequence Data. *Genetics* 175, 1251–1266. doi:10.1534/genetics.106.063305.

- Dordet-Frisoni, E., Faucher, M., Sagné, E., Baranowski, E., Tardy, F., Nouvel, L. X., et al. (2019). Mycoplasma Chromosomal Transfer: A Distributive, Conjugative Process Creating an Infinite Variety of Mosaic Genomes. *Front Microbiol* 10. doi:10.3389/fmicb.2019.02441.
- Dordet-Frisoni, E., Sagné, E., Baranowski, E., Breton, M., Nouvel, L. X., Blanchard, A., et al. (2014). Chromosomal transfers in mycoplasmas: when minimal genomes go mobile. *mBio* 5, e01958. doi:10.1128/mBio.01958-14.
- Dsouza, M., Larsen, N., and Overbeek, R. (1997). Searching for patterns in genomic data. *Trends in Genetics* 13, 497–498. doi:10.1016/S0168-9525(97)01347-4.
- Eyre, C., Muftah, W., Hiscox, J., Hunt, J., Kille, P., Boddy, L., et al. (2010). Microarray analysis of differential gene expression elicited in *Trametes versicolor* during interspecific mycelial interactions. *Fungal Biol* 114, 646–660. doi:10.1016/j.funbio.2010.05.006.
- Faucher, M., Nouvel, L.-X., Dordet-Frisoni, E., Sagné, E., Baranowski, E., Hygonenq, M.-C., et al. (2019). Mycoplasmas under experimental antimicrobial selection: The unpredicted contribution of horizontal chromosomal transfer. *PLoS Genet* 15, e1007910. doi:10.1371/journal.pgen.1007910.
- Fischbach, M. A., Walsh, C. T., and Clardy, J. (2008). The evolution of gene collectives: How natural selection drives chemical innovation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105, 4601–4608. doi:10.1073/pnas.0709132105.
- Folman, L. B., Klein Gunnewiek, P. J. A., Boddy, L., and de Boer, W. (2008). Impact of white-rot fungi on numbers and community composition of bacteria colonizing beech wood from forest soil. *FEMS Microbiol Ecol* 63, 181–191. doi:10.1111/j.1574-6941.2007.00425.x.
- Ghinet, M. G., Bordeleau, E., Beaudin, J., Brzezinski, R., Roy, S., and Burrus, V. (2011). Uncovering the prevalence and diversity of integrating conjugative elements in actinobacteria. *PLoS One* 6, e27846. doi:10.1371/journal.pone.0027846.
- Goshi, K., Uchida, T., Lezhava, A., Yamasaki, M., Hiratsu, K., Shinkawa, H., et al. (2002). Cloning and analysis of the telomere and terminal inverted repeat of the linear chromosome of *Streptomyces griseus*. *J Bacteriol* 184, 3411–3415. doi:10.1128/JB.184.12.3411-3415.2002.
- Gray, T. A., and Derbyshire, K. M. (2018). Blending genomes: distributive conjugal transfer in mycobacteria, a sexier form of HGT. *Mol Microbiol* 108, 601–613. doi:10.1111/mmi.13971.
- Grayston, S., and J. Germida, J. (2011). Sulfur-oxidizing bacteria as plant growth promoting rhizobacteria for canola. *Canadian Journal of Microbiology* 37, 521–529. doi:10.1139/m91-088.
- Guidot, A., Jiang, W., Ferdy, J.-B., Thébaud, C., Barberis, P., Gouzy, J., et al. (2014). Multihost experimental evolution of the pathogen *Ralstonia solanacearum* unveils genes involved in adaptation to plants. *Mol Biol Evol* 31, 2913–2928. doi:10.1093/molbev/msu229.
- Hassani, M. A., Durán, P., and Hacquard, S. (2018). Microbial interactions within the plant holobiont. *Microbiome* 6, 58. doi:10.1186/s40168-018-0445-0.
- Hehemann, J.-H., Arevalo, P., Datta, M. S., Yu, X., Corzett, C. H., Henschel, A., et al. (2016). Adaptive radiation by waves of gene transfer leads to fine-scale resource partitioning in marine microbes. *Nat Commun* 7, 12860. doi:10.1038/ncomms12860.
- Hiscox, J., Baldrian, P., Rogers, H. J., and Boddy, L. (2010). Changes in oxidative enzyme activity during interspecific mycelial interactions involving the white-rot fungus *Trametes versicolor*. *Fungal Genet Biol* 47, 562–571. doi:10.1016/j.fgb.2010.03.007.
- Hopwood, D. A. (2006). Soil to genomics: the *Streptomyces* chromosome. *Annu Rev Genet* 40, 1–23. doi:10.1146/annurev.genet.40.110405.090639.
- Hopwood, D. A., and Kieser, T. (1993). “Conjugative Plasmids of *Streptomyces*,” in *Bacterial Conjugation*, ed. D. B. Clewell (Boston, MA: Springer US), 293–311. doi:10.1007/978-1-4757-9357-4_11.
- Hopwood, D. A., and Sermonti, G. (1963). “The Genetics of *Streptomyces coelicolor*,” in *Advances in Genetics*, eds. E. W. Caspari and J. M. Thoday (Academic Press), 273–342. doi:10.1016/S0065-2660(08)60289-8.
- Hoshino, S., Onaka, H., and Abe, I. (2019). Activation of silent biosynthetic pathways and discovery of novel secondary metabolites in actinomycetes by co-culture with mycolic acid-containing bacteria. *J Ind Microbiol Biotechnol* 46, 363–374. doi:10.1007/s10295-018-2100-y.
- Ikeda, H., Kazuo, S., and Omura, S. (2014). Genome mining of the *Streptomyces avermitilis* genome and development of genome-minimized hosts for heterologous expression of biosynthetic gene clusters. *J Ind Microbiol Biotechnol* 41, 233–250. doi:10.1007/s10295-013-1327-x.
- Jenke-Kodama, H., and Dittmann, E. (2009). Evolution of metabolic diversity: insights from microbial polyketide syntheses. *Phytochemistry* 70, 1858–1866. doi:10.1016/j.phytochem.2009.05.021.
- Jensen, P. R. (2016). Natural Products and the Gene Cluster Revolution. *Trends Microbiol* 24, 968–977. doi:10.1016/j.tim.2016.07.006.

- Joshi, M. V., and Loria, R. (2007). *Streptomyces turgidiscabies* possesses a functional cytokinin biosynthetic pathway and produces leafy galls. *Mol. Plant Microbe Interact.* 20, 751–758. doi:10.1094/MPMI-20-7-0751.
- Kashtan, N., Roggensack, S. E., Rodrigue, S., Thompson, J. W., Biller, S. J., Coe, A., et al. (2014). Single-cell genomics reveals hundreds of coexisting subpopulations in wild *Prochlorococcus*. *Science* 344, 416–420. doi:10.1126/science.1248575.
- Kirby, K, and Chen, C.W. (2001). “Genome architecture,” in *Streptomyces: Molecular Biology and Biotechnology* (Swansea, UK: caister Academic Press), 5–26.
- Kram, K. E., Geiger, C., Ismail, W. M., Lee, H., Tang, H., Foster, P. L., et al. (2017). Adaptation of *Escherichia coli* to Long-Term Serial Passage in Complex Medium: Evidence of Parallel Evolution. *mSystems* 2, e00192-16. doi:10.1128/mSystems.00192-16.
- Labeda, D. P., Dunlap, C. A., Rong, X., Huang, Y., Doroghazi, J. R., Ju, K.-S., et al. (2017). Phylogenetic relationships in the family Streptomycetaceae using multi-locus sequence analysis. *Antonie Van Leeuwenhoek* 110, 563–583. doi:10.1007/s10482-016-0824-0.
- Langston, J. A., Shaghasi, T., Abbate, E., Xu, F., Vlasenko, E., and Sweeney, M. D. (2011). Oxidoreductive cellulose depolymerization by the enzymes cellobiose dehydrogenase and glycoside hydrolase 61. *Appl Environ Microbiol* 77, 7007–7015. doi:10.1128/AEM.05815-11.
- Laureti, L., Song, L., Huang, S., Corre, C., Leblond, P., Challis, G. L., et al. (2011). Identification of a bioactive 51-membered macrolide complex by activation of a silent polyketide synthase in *Streptomyces ambofaciens*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108, 6258–6263. doi:10.1073/pnas.1019077108.
- Lee, H.-H., Hsu, C.-C., Lin, Y.-L., and Chen, C. W. (2011). Linear plasmids mobilize linear but not circular chromosomes in *Streptomyces*: support for the “end first” model of conjugal transfer. *Microbiology (Reading)* 157, 2556–2568. doi:10.1099/mic.0.051441-0.
- Lehr, N. A., Schrey, S. D., Bauer, R., Hampp, R., and Tarkka, M. T. (2007). Suppression of plant defence response by a mycorrhiza helper bacterium. *New Phytol.* 174, 892–903. doi:10.1111/j.1469-8137.2007.02021.x.
- Lehr, N.-A., Schrey, S. D., Hampp, R., and Tarkka, M. T. (2008). Root inoculation with a forest soil streptomycete leads to locally and systemically increased resistance against phytopathogens in Norway spruce. *New Phytol.* 177, 965–976. doi:10.1111/j.1469-8137.2007.02322.x.
- Lesic, B., Zouine, M., Ducos-Galand, M., Huon, C., Rosso, M.-L., Prévost, M.-C., et al. (2012). A natural system of chromosome transfer in *Yersinia pseudotuberculosis*. *PLoS Genet* 8, e1002529. doi:10.1371/journal.pgen.1002529.
- Ling, L. L., Schneider, T., Peoples, A. J., Spoering, A. L., Engels, I., Conlon, B. P., et al. (2015). A new antibiotic kills pathogens without detectable resistance. *Nature* 517, 455–459. doi:10.1038/nature14098.
- Lorenzi, J.-N., Lespinet, O., Leblond, P., and Thibessard, A. (2021). Subtelomeres are fast-evolving regions of the *Streptomyces* linear chromosome. *Microbial Genomics*. doi:10.1099/mgen.0.000525.
- Lustenhouwer, N., Maynard, D. S., Bradford, M. A., Lindner, D. L., Oberle, B., Zanne, A. E., et al. (2020). A trait-based understanding of wood decomposition by fungi. *Proc Natl Acad Sci U S A* 117, 11551–11558. doi:10.1073/pnas.1909166117.
- Maddamsetti, R., and Lenski, R. E. (2018). Analysis of bacterial genomes from an evolution experiment with horizontal gene transfer shows that recombination can sometimes overwhelm selection. *PLoS Genet* 14, e1007199. doi:10.1371/journal.pgen.1007199.
- Manriquez, B., Muller, D., and Prigent-Combaret, C. (2021). Experimental Evolution in Plant-Microbe Systems: A Tool for Deciphering the Functioning and Evolution of Plant-Associated Microbial Communities. *Front Microbiol* 12, 619122. doi:10.3389/fmicb.2021.619122.
- Marchetti, M., Capela, D., Glew, M., Cruveiller, S., Chane-Woon-Ming, B., Gris, C., et al. (2010). Experimental evolution of a plant pathogen into a legume symbiont. *PLoS Biol* 8, e1000280. doi:10.1371/journal.pbio.1000280.
- Marschner, P., Crowley, D., and Rengel, Z. (2011). Rhizosphere interactions between microorganisms and plants govern iron and phosphorus acquisition along the root axis – model and research methods. *Soil Biology and Biochemistry* 43, 883–894. doi:10.1016/j.soilbio.2011.01.005.
- Martínez, A. T., Speranza, M., Ruiz-Dueñas, F. J., Ferreira, P., Camarero, S., Guillén, F., et al. (2005). Biodegradation of lignocellulosics: microbial, chemical, and enzymatic aspects of the fungal attack of lignin. *Int Microbiol* 8, 195–204.
- Marushima, K., Ohnishi, Y., and Horinouchi, S. (2009). CebR as a master regulator for cellulose/cellulooligosaccharide catabolism affects morphological development in *Streptomyces griseus*. *J Bacteriol* 191, 5930–5940. doi:10.1128/JB.00703-09.

- McDonald, M. J. (2019). Microbial Experimental Evolution - a proving ground for evolutionary theory and a tool for discovery. *EMBO Rep* 20, e46992. doi:10.15252/embr.201846992.
- McLeod, M. P., Warren, R. L., Hsiao, W. W. L., Araki, N., Myhre, M., Fernandes, C., et al. (2006). The complete genome of *Rhodococcus* sp. RHA1 provides insights into a catabolic powerhouse. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103, 15582–15587. doi:10.1073/pnas.0607048103.
- Moulin, L., Munive, A., Dreyfus, B., and Boivin-Masson, C. (2001). Nodulation of legumes by members of the beta-subclass of Proteobacteria. *Nature* 411, 948–950. doi:10.1038/35082070.
- Nicault, M., Tidjani, A.-R., Gauthier, A., Dumarcay, S., Gelhaye, E., Bontemps, C., et al. (2020a). Mining the Biosynthetic Potential for Specialized Metabolism of a *Streptomyces* Soil Community. *Antibiotics (Basel)* 9. doi:10.3390/antibiotics9050271.
- Nicault, M., Tidjani, A.-R., Gelhaye, E., Bontemps, C., and Leblond, P. (2020b). Genome Sequences of Five *Streptomyces* Strains Isolated at Microscale. *Microbiol Resour Announc* 9. doi:10.1128/MRA.00428-20.
- Nicault, M., Zaiter, A., Dumarcay, S., Chaimbault, P., Gelhaye, E., Leblond, P., et al. (2021). Elicitation of Antimicrobial Active Compounds by *Streptomyces*-Fungus Co-Cultures. *Microorganisms* 9. doi:10.3390/microorganisms9010178.
- Nimaichand, S., Devi, A. M., Tamreihao, K., Ningthoujam, D. S., and Li, W.-J. (2015). Actinobacterial diversity in limestone deposit sites in Hundung, Manipur (India) and their antimicrobial activities. *Front Microbiol* 6, 413. doi:10.3389/fmicb.2015.00413.
- Ochi, K., Okamoto, S., Tozawa, Y., Inaoka, T., Hosaka, T., Xu, J., et al. (2004). Ribosome engineering and secondary metabolite production. *Adv Appl Microbiol* 56, 155–184. doi:10.1016/S0065-2164(04)56005-7.
- Onaka, H. (2017). Novel antibiotic screening methods to awaken silent or cryptic secondary metabolic pathways in actinomycetes. *J Antibiot (Tokyo)* 70, 865–870. doi:10.1038/ja.2017.51.
- O'Neill J (2014). Review on Antimicrobial Resistance Antimicrobial Resistance: Tackling a crisis for the health and wealth of nations. Available at: <https://amr-review.org/>.
- Palaniyandi, S. A., Damodharan, K., Yang, S. H., and Suh, J. W. (2014). *Streptomyces* sp. strain PGPA39 alleviates salt stress and promotes growth of “Micro Tom” tomato plants. *J. Appl. Microbiol.* 117, 766–773. doi:10.1111/jam.12563.
- Palaniyandi, S. A., Yang, S. H., Zhang, L., and Suh, J.-W. (2013). Effects of actinobacteria on plant disease suppression and growth promotion. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 97, 9621–9636. doi:10.1007/s00253-013-5206-1.
- Pande, S., Pérez Escrivá, P., Yu, Y.-T. N., Sauer, U., and Velicer, G. J. (2020). Cooperation and Cheating among Germinating Spores. *Curr Biol* 30, 4745-4752.e4. doi:10.1016/j.cub.2020.08.091.
- Pettis, G. S., and Cohen, S. N. (1994). Transfer of the plJ101 plasmid in *Streptomyces lividans* requires a cis-acting function dispensable for chromosomal gene transfer. *Mol Microbiol* 13, 955–964. doi:10.1111/j.1365-2958.1994.tb00487.x.
- Power, J. J., Pinheiro, F., Pompei, S., Kovacova, V., Yüksel, M., Rathmann, I., et al. (2021). Adaptive evolution of hybrid bacteria by horizontal gene transfer. *Proc Natl Acad Sci U S A* 118, e2007873118. doi:10.1073/pnas.2007873118.
- Råberg, U., Edlund, M.-L., Terziev, N., and Land, C. J. (2005). Testing and evaluation of natural durability of wood in above ground conditions in Europe – an overview. *J Wood Sci* 51, 429–440. doi:10.1007/s10086-005-0717-8.
- Rahman, A., Cailliez-Grimal, C., Bontemps, C., Payot, S., Chaillou, S., Revol-Junelles, A.-M., et al. (2014). High genetic diversity among strains of the unindustrialized lactic acid bacterium *Carnobacterium maltaromaticum* in dairy products as revealed by multilocus sequence typing. *Appl Environ Microbiol* 80, 3920–3929. doi:10.1128/AEM.00681-14.
- Rinne-Garmston, K. T., Peltoniemi, K., Chen, J., Peltoniemi, M., Fritze, H., and Mäkipää, R. (2019). Carbon flux from decomposing wood and its dependency on temperature, wood N₂ fixation rate, moisture and fungal composition in a Norway spruce forest. *Glob Chang Biol* 25, 1852–1867. doi:10.1111/gcb.14594.
- Rylott, E. L., Jackson, R. G., Sabbadin, F., Seth-Smith, H. M. B., Edwards, J., Chong, C. S., et al. (2011). The explosive-degrading cytochrome P450 XplA: biochemistry, structural features and prospects for bioremediation. *Biochim Biophys Acta* 1814, 230–236. doi:10.1016/j.bbapap.2010.07.004.
- Scheuerl, T., Hopkins, M., Nowell, R. W., Rivett, D. W., Barraclough, T. G., and Bell, T. (2020). Bacterial adaptation is constrained in complex communities. *Nat Commun* 11, 754. doi:10.1038/s41467-020-14570-z.
- Schlösser, A., Aldekamp, T., and Schrepf, H. (2000). Binding characteristics of CebR, the regulator of the ceb operon required for cellobiose/cellotriose uptake in *Streptomyces reticuli*. *FEMS Microbiology Letters* 190, 127–132. doi:10.1016/S0378-1097(00)00304-9.

- Schrey, S. D., and Tarkka, M. T. (2008). Friends and foes: streptomycetes as modulators of plant disease and symbiosis. *Antonie Van Leeuwenhoek* 94, 11–19. doi:10.1007/s10482-008-9241-3.
- Schroeckh, V., Scherlach, K., Nützmann, H.-W., Shelest, E., Schmidt-Heck, W., Schuemann, J., et al. (2009). Intimate bacterial-fungal interaction triggers biosynthesis of archetypal polyketides in *Aspergillus nidulans*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106, 14558–14563. doi:10.1073/pnas.0901870106.
- Shapiro, B. J., Friedman, J., Cordero, O. X., Preheim, S. P., Timberlake, S. C., Szabó, G., et al. (2012). Population genomics of early events in the ecological differentiation of bacteria. *Science* 336, 48–51. doi:10.1126/science.1218198.
- Sheu, S.-Y., Chou, J.-H., Bontemps, C., Elliott, G. N., Gross, E., Dos Reis Junior, F. B., et al. (2013). *Burkholderia diazotrophica* sp. nov., isolated from root nodules of *Mimosa* spp. *Int J Syst Evol Microbiol* 63, 435–441. doi:10.1099/ijs.0.039859-0.
- Sheu, S.-Y., Chou, J.-H., Bontemps, C., Elliott, G. N., Gross, E., James, E. K., et al. (2012). *Burkholderia symbiotica* sp. nov., isolated from root nodules of *Mimosa* spp. native to north-east Brazil. *Int J Syst Evol Microbiol* 62, 2272–2278. doi:10.1099/ijs.0.037408-0.
- Singh, M., Awasthi, A., Soni, S. K., Singh, R., Verma, R. K., and Kalra, A. (2015). Complementarity among plant growth promoting traits in rhizospheric bacterial communities promotes plant growth. *Sci Rep* 5. doi:10.1038/srep15500.
- Slomka, S., Françoise, I., Hornung, G., Asraf, O., Biniashvili, T., Pilpel, Y., et al. (2020). Experimental Evolution of *Bacillus subtilis* Reveals the Evolutionary Dynamics of Horizontal Gene Transfer and Suggests Adaptive and Neutral Effects. *Genetics* 216, 543–558. doi:10.1534/genetics.120.303401.
- Stefanic, P., and Mandic-Mulec, I. (2009). Social interactions and distribution of *Bacillus subtilis* phenotypes at microscale. *J Bacteriol* 191, 1756–1764. doi:10.1128/JB.01290-08.
- Stokes, J. M., Yang, K., Swanson, K., Jin, W., Cubillos-Ruiz, A., Donghia, N. M., et al. (2020). A Deep Learning Approach to Antibiotic Discovery. *Cell* 180, 688–702.e13. doi:10.1016/j.cell.2020.01.021.
- Stursová, M., Zifčáková, L., Leigh, M. B., Burgess, R., and Baldrian, P. (2012). Cellulose utilization in forest litter and soil: identification of bacterial and fungal decomposers. *FEMS Microbiol Ecol* 80, 735–746. doi:10.1111/j.1574-6941.2012.01343.x.
- Stuttard, C. 1982 Temperate Phages of *Streptomyces venezuelae*: Lysogeny and Host Specificity Shown by Phages SV1 and SV2. *Microbiology* 128, 115–121. doi:10.1099/00221287-128-1-115.
- Suzuki, H., Marushima, K., Ohnishi, Y., and Horinouchi, S. (2008). A novel pair of terminal protein and telomere-associated protein for replication of the linear chromosome of *Streptomyces griseus* IFO13350. *Biosci Biotechnol Biochem* 72, 2973–2980. doi:10.1271/bbb.80454.
- Takasuka, T. E., Book, A. J., Lewin, G. R., Currie, C. R., and Fox, B. G. (2013). Aerobic deconstruction of cellulosic biomass by an insect-associated *Streptomyces*. *Sci Rep* 3, 1030. doi:10.1038/srep01030.
- Tenaillon, O., Barrick, J. E., Ribeck, N., Deatherage, D. E., Blanchard, J. L., Dasgupta, A., et al. (2016). Tempo and mode of genome evolution in a 50,000-generation experiment. *Nature* 536, 165–170. doi:10.1038/nature18959.
- Thoma, L., and Muth, G. (2012). Conjugative DNA transfer in *Streptomyces* by TraB: is one protein enough? *FEMS Microbiology Letters* 337, 81–88. doi:10.1111/1574-6968.12031.
- Thoma, L., and Muth, G. (2015). The conjugative DNA-transfer apparatus of *Streptomyces*. *Int J Med Microbiol* 305, 224–229. doi:10.1016/j.ijmm.2014.12.020.
- Thoma, L., and Muth, G. (2016). Conjugative DNA-transfer in *Streptomyces*, a mycelial organism. *Plasmid* 87–88, 1–9. doi:10.1016/j.plasmid.2016.09.004.
- Thoma, L., Vollmer, B., and Muth, G. (2016). Fluorescence microscopy of *Streptomyces* conjugation suggests DNA-transfer at the lateral walls and reveals the spreading of the plasmid in the recipient mycelium. *Environ Microbiol* 18, 598–608. doi:10.1111/1462-2920.13027.
- Tidjani, A.-R., Bontemps, C., and Leblond, P. (2020). Telomeric and sub-telomeric regions undergo rapid turnover within a *Streptomyces* population. *Sci Rep* 10, 7720. doi:10.1038/s41598-020-63912-w.
- Tidjani, A.-R., Lorenzi, J.-N., Toussaint, M., van Dijk, E., Naquin, D., Lespinet, O., et al. (2019a). Genome Sequences of 11 Conspecific *Streptomyces* sp. Strains. *Microbiol Resour Announc* 8. doi:10.1128/MRA.00863-19.
- Tidjani, A.-R., Lorenzi, J.-N., Toussaint, M., van Dijk, E., Naquin, D., Lespinet, O., et al. (2019b). Massive Gene Flux Drives Genome Diversity between Sympatric *Streptomyces* Conspecifics. *mBio* 10. doi:10.1128/mBio.01533-19.
- Traxler, M. F., Watrous, J. D., Alexandrov, T., Dorrestein, P. C., and Kolter, R. (2013). Interspecies interactions stimulate diversification of the *Streptomyces coelicolor* secreted metabolome. *mBio* 4. doi:10.1128/mBio.00459-13.

- Uroz, S., Oger, P., Lepleux, C., Collignon, C., Frey-Klett, P., and Turpault, M.-P. (2011). Bacterial weathering and its contribution to nutrient cycling in temperate forest ecosystems. *Res. Microbiol.* 162, 820–831. doi:10.1016/j.resmic.2011.01.013.
- van Bergeijk, D. A., Terlouw, B. R., Medema, M. H., and van Wezel, G. P. (2020). Ecology and genomics of Actinobacteria: new concepts for natural product discovery. *Nat Rev Microbiol* 18, 546–558. doi:10.1038/s41579-020-0379-y.
- Van den Bergh, B., Swings, T., Fauvart, M., and Michiels, J. (2018). Experimental Design, Population Dynamics, and Diversity in Microbial Experimental Evolution. *Microbiol Mol Biol Rev* 82, e00008-18. doi:10.1128/MMBR.00008-18.
- van der Meij, A., Worsley, S. F., Hutchings, M. I., and van Wezel, G. P. (2017). Chemical ecology of antibiotic production by actinomycetes. *FEMS Microbiol Rev* 41, 392–416. doi:10.1093/femsre/fux005.
- VanInsberghe, D., Arevalo, P., Chien, D., and Polz, M. F. (2020). How can microbial population genomics inform community ecology? *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 375, 20190253. doi:10.1098/rstb.2019.0253.
- Vicente, C. M., Thibessard, A., Lorenzi, J.-N., Benhadj, M., Hôtel, L., Gacemi-Kirane, D., et al. (2018). Comparative Genomics among Closely Related *Streptomyces* Strains Revealed Specialized Metabolite Biosynthetic Gene Cluster Diversity. *Antibiotics (Basel)* 7. doi:10.3390/antibiotics7040086.
- Vogelmann, J., Ammelburg, M., Finger, C., Guezguez, J., Linke, D., Flötenmeyer, M., et al. (2011). Conjugal plasmid transfer in *Streptomyces* resembles bacterial chromosome segregation by FtsK/SpoIIIE. *EMBO J* 30, 2246–2254. doi:10.1038/emboj.2011.121.
- Wei, G., Chen, W., Young, J. P. W., and Bontemps, C. (2009a). A new clade of Mesorhizobium nodulating *Alhagi sparsifolia*. *Syst Appl Microbiol* 32, 8–16. doi:10.1016/j.syapm.2008.11.003.
- Wei, G., Chen, W., Zhu, W., Chen, C., Young, J. P. W., and Bontemps, C. (2009b). Invasive Robinia pseudoacacia in China is nodulated by Mesorhizobium and Sinorhizobium species that share similar nodulation genes with native American symbionts. *FEMS Microbiol Ecol* 68, 320–328. doi:10.1111/j.1574-6941.2009.00673.x.
- Wenner, T., Roth, V., Fischer, G., Fourrier, C., Aigle, B., Decaris, B., et al. (2003). End-to-end fusion of linear deleted chromosomes initiates a cycle of genome instability in *Streptomyces ambofaciens*. *Mol Microbiol* 50, 411–425. doi:10.1046/j.1365-2958.2003.03698.x.
- Wollman, E. L., Jacob, F., and Hayes, W. (1956). Conjugation and genetic recombination in *Escherichia coli* K-12. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 21, 141–162. doi:10.1101/sqb.1956.021.01.012.
- Wood, D. W., Setubal, J. C., Kaul, R., Monks, D. E., Kitajima, J. P., Okura, V. K., et al. (2001). The genome of the natural genetic engineer *Agrobacterium tumefaciens* C58. *Science* 294, 2317–2323. doi:10.1126/science.1066804.
- Yang, C.-C., Tseng, S.-M., and Chen, C. W. (2015). Telomere-associated proteins add deoxynucleotides to terminal proteins during replication of the telomeres of linear chromosomes and plasmids in *Streptomyces*. *Nucleic Acids Res* 43, 6373–6383. doi:10.1093/nar/gkv302.
- Yang, C.-C., Tseng, S.-M., Pan, H.-Y., Huang, C.-H., and Chen, C. W. (2017). Telomere associated primase Tap repairs truncated telomeres of *Streptomyces*. *Nucleic Acids Res* 45, 5838–5849. doi:10.1093/nar/gkx189.
- Ziemert, N., Lechner, A., Wietz, M., Millán-Aguiñaga, N., Chavarria, K. L., and Jensen, P. R. (2014). Diversity and evolution of secondary metabolism in the marine actinomycete genus *Salinispora*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 111, E1130-1139. doi:10.1073/pnas.1324161111.