

IMPLICATION D'HFQ DANS LA FORMATION DE BIOFILM ET DANS LA
COLONISATION DES RACINES DE PLANTES CHEZ *BACILLUS SUBTILIS*

par

Jessica Carrier

mémoire présenté au Département de biologie en vue
de l'obtention du grade de maître ès sciences (M.Sc.)

FACULTÉ DES SCIENCES
UNIVERSITÉ DE SHERBROOKE

Sherbrooke, Québec, Canada, août 2018

Le 16 août 2018

le jury a accepté le mémoire de Madame Jessica Carrier dans sa version finale.

Membres du jury

Professeure Pascale Beauregard

Directrice de recherche

Département de biologie

Professeur Éric Massé

Évaluateur interne

Département de biochimie

Professeur Sébastien Rodrigue

Président-rapporteur

Département de biologie

SOMMAIRE

Le biofilm bactérien est le mode de vie le plus privilégié par les microorganismes dans l'environnement. Il peut avoir des répercussions positives pour les microorganismes ainsi que pour l'hôte, lorsqu'il se forme sur les racines de plante. La symbiose formée entre les bactéries du biofilm et les racines de plante permet une défense de celle-ci contre les bactéries pathogènes en plus d'aider à sa croissance. *Bacillus subtilis* est une rhizobactérie à Gram positif capable de former du biofilm sur les racines de plantes. Cette bactérie est également utilisée comme biofertilisant et agent de lutte biologique en agriculture ce qui lui confère un rôle important sur le plan environnemental.

Le biofilm est formé lorsque la voie de signalisation menant à la production de la matrice extracellulaire est activée. Cette voie de signalisation peut être activée par des polysaccharides végétaux qui sont l'un des signaux externes pouvant déclencher la formation du biofilm. Des études ont démontré que les gènes clés de la formation du biofilm sont régulés, entre autres, par leur niveau d'ARNm. En effet, le répresseur de la formation du biofilm *sinR* peut être dégradé par une RNase, ce qui induit le biofilm.

Ces différents ARNm peuvent être régulés par des chaperonnes d'ARNs tels que Hfq. Dans mon projet de recherche, la protéine Hfq sera étudiée pour sa possible implication dans la régulation de la voie de signalisation de la formation de biofilm. Cette protéine est plus étudiée et connue chez les bactéries à Gram négatif que chez les bactéries à Gram positif comme *B. subtilis*. Chez les premières, Hfq joue un rôle dans la régulation post-transcriptionnelle des gènes. Cette chaperonne régule certaines fonctions telles que la croissance, la résistance au stress, la virulence et la motilité. Chez les bactéries à Gram positif, la régulation et la fonction de Hfq ne sont pas bien connues et caractérisées.

Par conséquent, l'hypothèse à la base des travaux de recherche rapportés dans ce mémoire est que Hfq pourrait agir sur la stabilité des ARNm, influençant ainsi la formation de biofilm et la colonisation des racines des plantes. Pour tester cette hypothèse, différentes techniques sont utilisées pour analyser la formation de biofilm *in vitro*, incluant la cytométrie en flux, la microscopie à fluorescence et la PCR quantitative. Mes résultats démontrent que la surproduction de la protéine Hfq permet une augmentation de la formation de biofilm et un changement de phénotype alors que la délétion n'affecte pas la formation de biofilm. Ensuite, la colonisation des racines de plante par *B. subtilis* n'est pas affectée par la surproduction ou la délétion de la protéine Hfq. Finalement, des analyses de PCR quantitative suggèrent que la surproduction de la protéine Hfq n'affecte pas l'expression de différents gènes clés au cours de la formation de biofilm.

Mots clés : *Bacillus subtilis*, biofilm, voie de signalisation, chaperonne d'ARN, Hfq, surfactine

REMERCIEMENTS

Je tiens tout d'abord à remercier ma directrice de recherche Pascale Beauregard pour m'avoir permis de faire mes crédits de recherche ainsi que ma maîtrise dans son laboratoire. J'ai pu effectuer mes recherches sur un sujet qui me passionne, la microbiologie environnementale.

Je voudrais également remercier tous les membres du laboratoire passé et actuel pour leur soutien au quotidien tant dans les bons que les moins bons moments. Je remercie aussi toutes les personnes avec lesquels j'ai participé au souper de labo et à la tant convoitée coupe PBB au cours de ces deux dernières années.

Je voudrais aussi remercier mes conseillers Éric Massé et Sébastien Rodrigue pour leurs précieux conseils tout au long de ma maîtrise. J'aimerais également remercier Daniel Garneau pour son aide en microscopie et en cytométrie en flux, Lauriane Giroux et Sylvain Lerat pour la PCR quantitative et Auréliane Michaud pour l'extension d'amorce.

Je tiens également à remercier l'Université de Sherbrooke ainsi que les organismes subventionnaires pour mon projet de recherche soit le CRSNG, le Centre SÈVE et la Fondation Canadienne pour l'Innovation (FCI). Finalement, je voudrais remercier mes parents qui ont toujours été présents pour moi tout au long de mes études supérieures.

TABLE DES MATIÈRES

SOMMAIRE.....	iv
REMERCIEMENTS	vi
TABLE DES MATIÈRES.....	vii
LISTE DES ABRÉVIATIONS	xi
LISTE DES TABLEAUX	xiv
LISTE DES FIGURES	xv
CHAPITRE 1.....	1
INTRODUCTION GÉNÉRALE.....	1
1.1 Le biofilm bactérien.....	1
1.1.1 Domaine médical	2
1.1.2 Domaine industriel.....	2
1.1.3 Domaine environnemental.....	2
1.2 <i>Bacillus subtilis</i>	3
1.3 Biofilm chez <i>Bacillus subtilis</i>	4
1.3.1 Voies de signalisation	4
1.3.2 Signaux environnementaux.....	6
1.3.2.1 Polysaccharides de plantes	6
1.3.2.2 Surfactine	6
1.3.3 Stabilité de l'ARN messager.....	8

1.4 La chaperonne d'ARN Hfq	9
1.4.1 Les chaperonnes d'ARN chez les procaryotes	9
1.4.2 Chez les bactéries à Gram négatif.....	9
1.4.2.1 Exemple <i>Escherichia coli</i>	11
1.4.2.2 Exemple <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	11
1.4.3 Chez les bactéries à Gram positif.....	11
1.4.3.1 Exemple <i>Staphylococcus aureus</i>	12
1.4.4 Hfq chez <i>Bacillus subtilis</i>	12
1.5 Hypothèse et objectifs de maîtrise.....	13
CHAPITRE 2.....	15
MATÉRIEL ET MÉTHODES	15
2.1 Souches et milieux de culture.....	15
2.2 Phénotype des biofilms sur milieu gélosé	17
2.3 Cytométrie en flux	17
2.3.1 Fixation des biofilms	17
2.3.2 Analyse au cytomètre en flux	18
2.4 Colonisation des racines d' <i>Arabidopsis thaliana</i>	19
2.4.1 Croissance des plantules d' <i>Arabidopsis thaliana</i>	19
2.4.2 Croissance des bactéries	19
2.4.3 Microscopie à fluorescence	20
2.5 PCR quantitative.....	20
2.5.1 Extraction d'ARN	20

2.5.2 Transcription inverse	22
2.5.3 qPCR.....	22
2.6 Cartographie de la région du 5' UTR du gène <i>srfAA</i>	25
CHAPITRE 3.....	27
RÉSULTATS	27
3.1 Caractérisation de l'effet de la chaperonne d'ARN Hfq sur la formation de biofilm et la colonisation des racines de plante	27
3.1.1 Caractérisation de l'effet d'Hfq sur la formation de biofilm	27
3.1.1.1 Expression de la matrice extracellulaire	28
3.1.2 Caractérisation de l'effet d'Hfq sur la colonisation des racines de plante.....	32
3.2 Détermination de l'effet de la chaperonne d'ARN Hfq sur différents gènes impliqués lors de la formation de biofilm	34
3.2.1 Expression du gène <i>hfq</i> lors de la formation de biofilm	34
3.2.2 Expression de gènes clés dans la voie de signalisation de la formation de biofilm	37
3.3 Vérification de l'effet de la chaperonne d'ARN Hfq sur l'ARNm de la surfactine	37
3.3.1 Cartographie de la région du 5' UTR du gène de la sous-unité A de la surfactine synthétase (<i>srfAA</i>).....	39
3.3.2 Expression du gène de la sous-unité A de la surfactine synthétase (<i>srfAA</i>)	42
CHAPITRE 4.....	44
DISCUSSION GÉNÉRALE	44
4.1 Caractérisation de l'effet de la chaperonne d'ARN Hfq sur la formation de biofilm et la colonisation des racines de plante	44
4.2 Détermination de l'effet de la chaperonne d'ARN Hfq sur différents gènes impliqués lors de la formation de biofilm	48

4.3 Vérification de l'effet de la chaperonne d'ARN Hfq sur l'ARNm de la surfactine	49
CHAPITRE 5.....	52
CONCLUSION	52
ANNEXE 1.....	54
BIBLIOGRAPHIE	57

LISTE DES ABRÉVIATIONS

5' UTR	<i>5' untranslated transcribed region</i>
ADN	Acide désoxyribonucléique
ADNc	ADN complémentaire
ADNg	ADN génomique
ARN(s)	Acide ribonucléique
ARNm	ARN messenger
ARNt	ARN de transfert
C	Cytosine
cat	Chloramphénicol acétyl transférase
Ct	<i>Threshold cycle</i>
DAPI	4',6-diamidino-2-phénylindole
DO ₆₀₀	Densité optique à 600 nm
FACS	<i>Fluorescence-activated cell sorting</i>
G	Guanine
g	Gramme
h	Heure
IPTG	Isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside
L	Litre
LB	<i>Lysogeny broth</i>
M	Molaire

mg	Milligramme
min	Minute
ml	Millilitre
mls	Érythromycine et Lincomycine
mM	Millimolaire
MOPS	Acide 3-(N-morpholino) propanesulfonique
MS	Murashige skoog
MSgg	<i>Minimal salts glutamate glycerol</i>
MSNc	<i>Minimal salts nitrogen cellobiose</i>
MSNg	<i>Minimal salts nitrogen glycerol</i>
nm	Nanomètre
pb	Paire de base
PBS	<i>Phosphate buffered saline</i>
PCR	<i>Polymerase chain reaction</i>
PF	Paraformaldéhyde
PGPR	<i>Plant growth promoting rhizobacteria</i>
PNPase	Polynucléotide phosphorylase
qPCR	PCR quantitative
RBS	<i>Ribosome binding site</i>
RNase	Ribonucléase
RPM	Rotation par minute
RT	<i>Reverse transcriptase</i>

sec	Seconde
spec	Spectinomycine
WT	<i>Wild type</i>
yfp	<i>Yellow fluorescent protein</i>
μg	Microgramme
μl	Microlitre
μM	Micromolaire
°C	Degré Celsius

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1. Souches de <i>Bacillus subtilis</i> utilisées dans cette étude	15
Tableau 2. Amorces utilisées pour les analyses en qPCR	23
Tableau 3. Gènes analysés au qPCR	24
Tableau 4. Amorces utilisées lors de la cartographie de la région du 5' UTR de <i>srfAA</i>	25

LISTE DES FIGURES

Figure 1. Voie de signalisation Spo0A menant à la formation de biofilm chez <i>B. subtilis</i> .	5
Figure 2. Activation de l'expression de la surfactine par la phéromone ComX	7
Figure 3. Induction de la formation de matrice extracellulaire par la surfactine	8
Figure 4. Structure générale de la chaperonne d'ARN Hfq	10
Figure 5. Phénotype des biofilms sur milieux gélosés	28
Figure 6. Expression de la matrice extracellulaire	29
Figure 7. Contrôle de la spécificité de l'effet de la surproduction de la protéine Hfq	31
Figure 8. Colonisation des racines d' <i>Arabidopsis thaliana</i> par <i>Bacillus subtilis</i>	32
Figure 9. Niveau de colonisation des racines d' <i>Arabidopsis thaliana</i> par <i>Bacillus subtilis</i>	33
Figure 10. Expression relative du gène <i>hfq</i> dans le temps lors de la formation de biofilm	35

Figure 11. Vérification de la surproduction de la protéine Hfq dans le temps lors de la formation de biofilm	36
Figure 12. Expression relative de gènes clés dans la voie de signalisation menant à la formation de biofilm	38
Figure 13. Cartographie du 5' UTR du gène de la sous-unité A de la surfactine synthétase (<i>srfAA</i>)	40
Figure 14. Cartographie précisée du 5' UTR du gène de la sous-unité A de la surfactine synthétase (<i>srfAA</i>)	41
Figure 15. Expression relative du gène de la sous-unité A de la surfactine synthétase (<i>srfAA</i>)	43

CHAPITRE 1

INTRODUCTION GÉNÉRALE

1.1 Le biofilm bactérien

Dans la vie de tous les jours, nous sommes en cohabitation constante avec des bactéries qui se retrouvent partout dans l'environnement. Ces microorganismes vivent la plupart du temps en communauté sous la forme de biofilm, qui est le mode de vie le plus adopté dans l'environnement par les bactéries. Il est défini comme étant une communauté bactérienne multicellulaire encapsulée dans une matrice extracellulaire qui permet la protection des bactéries contre les agressions physiques ou chimiques. La majorité des bactéries possèdent la faculté d'en fabriquer un (López *et al.*, 2010 ; Mielich-Süss et Lopez, 2015 ; Vlamakis *et al.*, 2013 ; Cairns *et al.*, 2014).

Lors de la formation du biofilm, les bactéries vont communiquer entre elles par le phénomène de *quorum sensing*. Cette communication de cellules à cellules se produit soit entre différentes espèces microbiennes, ce qui est le plus représenté dans la nature, ou bien entre divers membres d'une même espèce (López *et al.*, 2010 ; Mielich-Süss et Lopez, 2015 ; Vlamakis *et al.*, 2013). Outre le *quorum sensing*, la communication entre cellules peut également se faire par la sécrétion de métabolites secondaires comme des antibiotiques ou des sidérophores (Mielich-Süss et Lopez, 2015). Les biofilms sont retrouvés pratiquement partout dans notre environnement et ils peuvent causer bien des problèmes dans notre société par exemple dans les industries ou les hôpitaux. La formation de biofilm a été particulièrement bien étudiée chez certaines bactéries, telles qu'*Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* et *Bacillus subtilis* (Pratt et Kolter 1998 ; Ryder *et al.*, 2007 ; O'Gara 2007 ; Vlamakis *et al.*, 2013).

1.1.1 Domaine médical

Tout d'abord, les biofilms peuvent se former à partir de bactéries pathogènes chez l'humain et ainsi être à l'origine de certaines infections. Ces communautés bactériennes peuvent se former sur des structures solides de toutes sortes dans les hôpitaux, contaminant ainsi des équipements médicaux ou le corps humain. En effet, le biofilm peut alors se former sur des plaies, des cathéters ou des implants (Hall-Stoodley *et al.*, 2004 ; López *et al.*, 2010). Ces biofilms vont mener à des infections chroniques associées à des polymères et qui sont très difficiles à traiter (Hall-Stoodley *et al.*, 2004). Les bactéries vont devenir résistantes aux antibiotiques grâce à la formation de biofilm (Mielich-Süss et Lopez, 2015 ; López *et al.*, 2010) puisque l'antibiotique ne peut pas entrer en contact avec les bactéries emprisonnées dans la matrice. De plus, des infections chez l'humain peuvent également être dues à des biofilms sur les dents, la peau ou le tractus urinaire (Hall-Stoodley *et al.*, 2004 ; López *et al.*, 2010).

1.1.2 Domaine industriel

Les biofilms peuvent aussi provoquer de graves problèmes dans diverses industries. Les biofilms peuvent obstruer les filtres tout en générant des métabolites nocifs dans les systèmes industriels aquatiques (Costerton *et al.*, 1987). Ils peuvent aussi se former sur la coque d'un navire, dans des tours de refroidissement ou dans des pipelines (Vlamakis *et al.*, 2013 ; Mielich-Süss et Lopez, 2015 ; Cairns *et al.*, 2014 ; López *et al.*, 2010). De plus, ils peuvent même causer de la corrosion sur des métaux industriels (Costerton *et al.*, 1987).

1.1.3 Domaine environnemental

Les biofilms sont présents partout autour de nous et ils peuvent aussi avoir des aspects positifs. Ils peuvent être particulièrement bénéfiques dans la nature lorsqu'ils sont retrouvés associés à

des racines de plantes. En effet, des biofilms formés par des bactéries bénéfiques vont aider à la croissance de la plante et induire une résistance contre divers pathogènes. Ces bactéries peuvent ainsi servir d'alternative biologique aux engrais et pesticides en milieu agricole. Finalement, des biofilms multispèces ont également un rôle lors du traitement des eaux usées par bioremédiation puisqu'ils peuvent immobiliser des composés toxiques qu'ils peuvent ensuite dégrader (Vlamakis *et al.*, 2013 ; Mielich-Süss et Lopez, 2015 ; Cairns *et al.*, 2014 ; López *et al.*, 2010 ; Singh *et al.*, 2006).

1.2 *Bacillus subtilis*

Les biofilms bactériens ont été caractérisés en partie grâce aux études effectuées sur l'organisme modèle *Bacillus subtilis*, une bactérie à Gram positif ubiquitaire du sol. Cette bactérie possède l'avantage d'avoir un génome entièrement séquencé, et est facile à manipuler génétiquement, ce qui favorise la compréhension des gènes impliqués dans la formation de biofilm (Zhu et Stülke, 2018).

B. subtilis est souvent retrouvé dans la rhizosphère, connue comme étant la région qui se retrouve autour des racines de plante. La rhizosphère est riche en sécrétions végétales, qui fournissent des nutriments aux bactéries et favorisent leur croissance. Cette abondance de nutriments permet aux « *plant growth promoting rhizobacteria* » (PGPR) comme *B. subtilis* de coloniser les racines et ainsi favoriser la croissance de la plante. Étant donné que cet environnement supporte la colonisation de *B. subtilis* sur les racines, il y a formation de biofilm à la surface de celles-ci (Mielich-Süss et Lopez, 2015 ; Vlamakis *et al.*, 2013 ; Beauregard *et al.*, 2013). Puisque que *B. subtilis* peut favoriser la croissance de la plante et protéger celle-ci contre des infections par des bactéries pathogènes, elle est utilisée comme un biofertilisant et un agent de contrôle biologique en agriculture (Chen *et al.*, 2013).

1.3 Biofilm chez *Bacillus subtilis*

Le biofilm en tant que tel est défini comme une communauté de microorganismes encapsulée dans une matrice extracellulaire (Vlamakis *et al.*, 2013 ; Mielich-Süss et Lopez, 2015 ; Cairns *et al.*, 2014 ; López *et al.*, 2010). Les biofilms peuvent être composés de différentes espèces, comme mentionnés précédemment, ou d'une seule comme ceux formés par *B. subtilis* lors des essais réalisés en laboratoire.

Il existe trois stades de développement dans le cycle de vie du biofilm, qui est composé de plusieurs types cellulaires qui ont chacun leurs fonctions propres. Premièrement, il y a des cellules motiles qui permettent d'atteindre une interface, par exemple une racine, pour ensuite permettre l'établissement du biofilm. Ensuite, les cellules productrices de matrice extracellulaire assurent l'encapsulation de la communauté bactérienne dans les polymères produits par ces cellules. Le biofilm n'est pas seulement formé de cellules qui produisent de la matrice extracellulaire, celles-ci représentent une sous-population de la communauté bactérienne dont la proportion augmente lorsque le biofilm est formé. La formation du biofilm implique également des cellules capables de produire une molécule de *quorum sensing*, la surfactine. Finalement, lorsque le biofilm est mature, les bactéries vont sporuler et il y a ainsi une dispersion de la communauté bactérienne. Ces spores sont formées lorsque les conditions ne sont plus propices à la survie de la cellule. (Vlamakis *et al.*, 2013 ; Mielich-Süss et Lopez, 2015 ; Cairns *et al.*, 2014 ; López *et al.*, 2010).

1.3.1 Voies de signalisation

La production de matrice est régulée par des signaux extracellulaires et/ou intracellulaires qui varient grandement selon les conditions environnementales. Ces signaux peuvent activer plusieurs voies de signalisation pour mener à la production de matrice extracellulaire, dont la plus importante est la voie du régulateur majeur Spo0A. Cette voie débute par l'activation d'une

ou plusieurs kinases (KinA, KinB, KinC ou KinD; Figure 1). Plusieurs signaux ou conditions environnementales et cellulaires peuvent induire l'activité des kinases. Ils peuvent provenir de la bactérie elle-même, par exemple la surfactine qui est sécrétée par certaines bactéries du biofilm, ou ils peuvent être extérieurs, comme les polysaccharides présents à la surface des cellules de plantes (Vlamakis *et al.*, 2013 ; Mielich-Süss et Lopez, 2015 ; Cairns *et al.*, 2014).

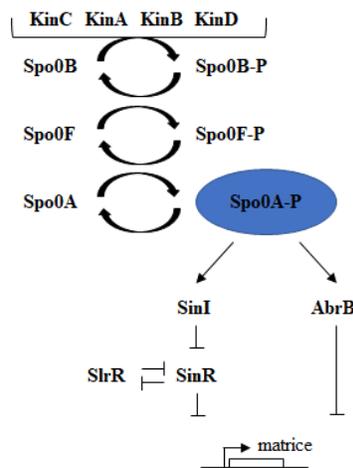


Figure 1. Voie de signalisation Spo0A menant à la formation de biofilm chez *B. subtilis* (modifiée de Mielich-Süss et Lopez, 2015).

Lorsque les kinases sont activées, elles vont initier un phospho-relais en phosphorylant Spo0B, qui va transférer son phosphate à Spo0F puis à Spo0A (Spo0A-P). Lorsque le niveau cellulaire de Spo0A-P est intermédiaire, il y a expression de matrice extracellulaire (Vlamakis *et al.*, 2013). En effet, cette protéine phosphorylée va permettre l'activation de la transcription du gène codant pour SinI, un anti-répresseur de la protéine SinR qui réprime lui-même l'expression des gènes de la matrice extracellulaire. La protéine SlrR vient aussi jouer un rôle de répression sur la protéine SinR. Finalement, Spo0A-P réprime AbrB qui n'est plus en mesure de réprimer efficacement l'expression des gènes de la matrice (Figure 1). Les gènes exprimant la matrice extracellulaire sont composés de deux principaux opérons soit *epsA-O* et *tapA-sipW-tasA* aussi nommé *eps* et *tapA*. L'opéron *eps* comprend 15 gènes (A à O) et est responsable de la fabrication

d'exopolysaccharides, un des composants majeurs de la matrice extracellulaire. L'opéron *tapA* encode pour des protéines structurales nécessaires à la formation de la matrice du biofilm. La protéine TasA forme des fibres amyloïdes qui sont assemblées par la protéine TapA et ancrées dans la paroi cellulaire. La protéine SipW quant-à elle est une peptidase signal qui modifie ces deux dernières protéines lors de leur sécrétion (Vlamakis *et al.*, 2013 ; Mielich-Süss et Lopez, 2015 ; Cairns *et al.*, 2014).

1.3.2 Signaux environnementaux

1.3.2.1 Polysaccharides de plantes

La formation du biofilm par *B. subtilis* peut être stimulée par différents signaux environnementaux. Les polysaccharides de plantes qui sont des composants majeurs de la paroi cellulaire des cellules végétales en font partie. Il a été démontré par Beauregard *et al.* (2013) que tout particulièrement la pectine peut induire la formation de biofilm. Cependant, la voie d'activation menant à la formation du biofilm par les polysaccharides de plantes reste inconnue. Cette association entre *B. subtilis* et la plante est efficace, puisqu'en plus de servir de signal, les polysaccharides végétaux peuvent être utilisés comme source de carbone pour permettre la synthèse de la matrice extracellulaire (Beauregard *et al.*, 2013 ; Habib *et al.*, 2017).

1.3.2.2 Surfactine

La surfactine est un lipopeptide avec des propriétés de biosurfactant qui aide à la mobilité des cellules sur une surface solide. De plus, la surfactine est une molécule antimicrobienne qui peut inhiber le processus de développement des autres bactéries (López *et al.*, 2010 ; Aleti *et al.*, 2016 ; Debois *et al.*, 2015 ; Vollenbroich *et al.*, 1994). Finalement, la surfactine est aussi une molécule de *quorum sensing* observée chez *B. subtilis* comme induisant la formation de biofilm

(López *et al.*, 2010). Cette molécule est synthétisée par la surfactine synthétase, un complexe enzymatique de synthèse des peptides non ribosomiques qui comprend quatre sous-unités distinctes (Aleti *et al.*, 2016 ; Li *et al.*, 2015 ; Vollenbroich *et al.*, 1994 ; Marvasi *et al.*, 2010). Ce complexe est encodé par l'opéron *srfAA-AD*. À noter que des études de transcriptomique suggèrent que l'ARN messager (ARNm) de la sous-unité A de la surfactine synthétase (*srfAA*) posséderait un 5' UTR, ce qui n'a pas été confirmé (Nicolas *et al.*, 2012). Lorsque cet ARNm est clivé par une RNase III sa quantité cellulaire est diminuée, ce qui porte à croire que ce gène peut être ciblé par des RNase (DiChiara *et al.*, 2016).

L'activation de la transcription de l'opéron *srfAA-AD*, et donc la production de surfactine est médiée entre autres par une molécule de *quorum sensing* nommée ComX. ComX va activer l'histidine kinase membranaire ComP qui sera en mesure d'activer le facteur de transcription ComA. Ce facteur de transcription va ensuite permettre l'expression de l'opéron *srfAA-AD*, et subséquemment la production de surfactine (Figure 2) (López *et al.*, 2009b ; López *et al.*, 2010).

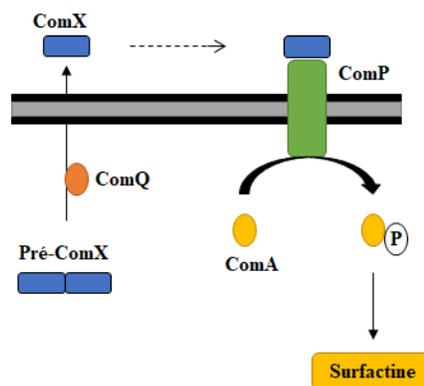


Figure 2. Activation de l'expression de la surfactine par la phéromone ComX (modifiée de López *et al.*, 2009b).

À la suite de sa production et sa sécrétion hors des cellules, la surfactine va se lier à la membrane cellulaire des bactéries pour former des pores. La formation de ces pores va induire une fuite de potassium à l'extérieur des cellules puisque ces pores sont sélectifs pour ce cation. Cette fuite

va induire un gradient de potassium dans la cellule causée par le changement de concentration intracellulaire de potassium. La kinase KinC, décrite ci-dessus comme étant une protéine transductrice du signal de formation du biofilm, va répondre à un changement de concentration de potassium intracellulaire en phosphorylant Spo0A (Figure 3). La phosphorylation de Spo0A va mettre en marche la voie de signalisation permettant l'expression de la matrice extracellulaire et ainsi du biofilm (López *et al.*, 2009a).

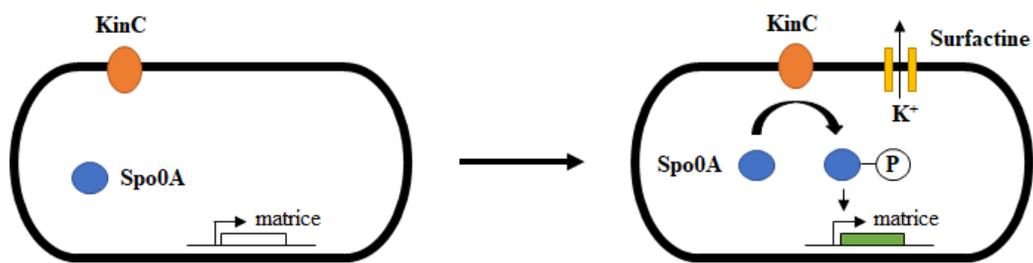


Figure 3. Induction de la formation de matrice extracellulaire par la surfactine (modifiée de López *et al.*, 2009a).

1.3.3 Stabilité de l'ARN messager

La voie de signalisation menant à la formation de biofilm est composée de plusieurs gènes qui sont régulés en fonction de l'état de la bactérie à un moment donné. Il a été démontré par Deloughery *et al.* (2016) que le niveau d'ARNm de certains gènes pouvait affecter la formation de biofilm. En effet, le complexe protéique YlbF-YmcA-YaaT est capable d'influencer le niveau de l'ARNm de *sinR* par son interaction avec l'endoribonucléase RNase Y. La dégradation de l'ARNm de *sinR* par la RNase Y mène à une diminution de l'expression du répresseur des gènes de la matrice, et donc à une augmentation de la production de matrice extracellulaire et l'induction de la formation de biofilm.

1.4 La chaperonne d'ARN Hfq

1.4.1 Les chaperonnes d'ARN chez les procaryotes

Une chaperonne d'ARN est une protéine qui se lie transitoirement et non spécifiquement à un ARN pour en corriger le repliement (Rajkowitsch *et al.*, 2007). Il existe différents types de protéines ayant une activité de chaperonne d'ARN. La protéine StpA est un régulateur global de transcription chez *Escherichia coli* qui démontre une forte activité de chaperonne d'ARN. Les protéines « *cold shock domain-containing protein* (CspA ou CspB) » retrouvées respectivement chez *E. coli* et *B. subtilis* corrigent les défauts de repliement de l'ARN en condition de froid chez ces bactéries. Finalement, la protéine Hfq, qui a une forte activité d'hybridation avec l'ARN, fait aussi partie des chaperonnes d'ARN. Elle interagit avec de petits ARNs régulateurs et leurs ARN messenger (ARNm) associés pour permettre une régulation post-transcriptionnelle (Rajkowitsch *et al.*, 2007 ; Semrad, 2011).

1.4.2 Chez les bactéries à Gram négatif

La protéine Hfq est une chaperonne d'ARN bien caractérisée chez les bactéries à Gram négatif comme jouant un rôle dans la régulation post-transcriptionnelle des gènes. Elle permet, entre autres, de réguler certaines fonctions chez ces bactéries comme la croissance, la résistance au stress, la virulence et la motilité (Vogel et Luisi, 2011).

Cette chaperonne fait partie de la famille des protéines Sm-like (Lsm) qui est caractérisée par une forme de beigne comprenant six monomères identiques qui se lient à l'ARN. Cette protéine est donc considérée comme un homohexamère où chaque monomère comprend une hélice α et cinq feuillets β (Figure 4). Cette chaperonne permet l'appariement des petits ARNs régulateurs à leurs ARNm associés. Hfq comprend 3 faces distinctes soit la proximale, la distale et le centre

de l'anneau. La face proximale permet la liaison des petits ARNs régulateurs, la distale l'appariement à des ARNm associés et le centre peut être requis pour la liaison de certains petits ARNs régulateurs (De Lay *et al.*, 2013).

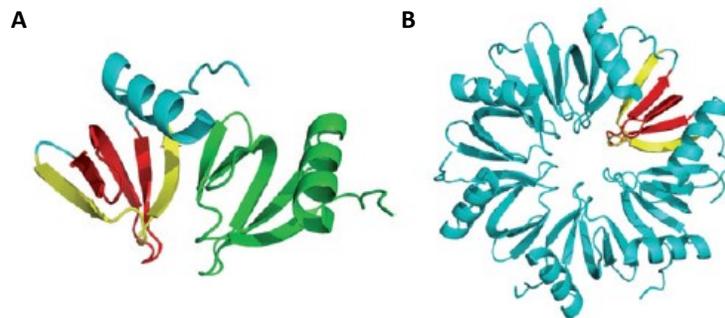


Figure 4. Structure générale de la chaperonne d'ARN Hfq. A) Structure de deux monomères de la protéine (bleu : hélice α ; jaune et rouge : feuillet β). B) Structure de l'homohexamère Hfq (tirée de Vogel et Luisi, 2011).

Hfq est donc en mesure de réguler certains ARNm en affectant leur traduction ou leur stabilité. Pour l'inhibition de la traduction d'un ARNm, Hfq bloquera les ribosomes et l'ARNm sera ensuite dégradé par le dégradosome d'ARN. Chez *Escherichia coli*, le dégradosome est composé de différentes enzymes (ex. RNase E, PNPase, hélicase, émolase) induisant une dégradation de l'ARNm. Il peut aussi y avoir une dégradation de l'ARNm médié par Hfq indépendamment du blocage de la traduction (De Lay *et al.*, 2013). Finalement, il existe aussi des cas où le « *ribosome binding site* » (RBS) est libéré par la liaison de Hfq avec l'ARNm ce qui permet la traduction de celui-ci (Lalaouna *et al.*, 2013).

1.4.2.1 Exemple *Escherichia coli*

La chaperonne d'ARN Hfq a été découverte chez *Escherichia coli*. Elle doit son nom à un facteur hôte essentiel du bactériophage Q β (Franze de Fernandez *et al.*, 1968). Dans la littérature, *E. coli* est décrit comme ayant environ 100 petits ARNs régulateurs dont plusieurs requièrent la protéine Hfq pour leur activité (Massé *et al.*, 2003). Il existe, entre autres, un petit ARN régulateur nommé RyhB qui joue un rôle lors de la limitation en Fer. Ce petit ARN régulateur va interagir avec Hfq et la RNase E pour induire la dégradation de l'ARNm *sodB* via l'inhibition de la traduction (Aiba, 2007).

1.4.2.2 Exemple *Pseudomonas aeruginosa*

Hfq est très important pour la virulence de cette bactérie pathogène. Les souches qui provoquent des infections du tractus urinaire ou des yeux perdent de leur virulence à la suite de la délétion d'*hfq*. La motilité de la souche lors de l'infection est aussi touchée par l'absence d'*hfq*. Une analyse transcriptomique a révélé qu'environ 15 % des gènes de *P. aeruginosa* sont affectés par la délétion d'*hfq* (Chao et Vogel, 2010). De plus, cet organisme possède aussi des petits ARNs régulateurs liants Hfq, soit PrrF1 et PrrF2 qui ont le même rôle que RyhB chez *E. coli* en condition de limitation de Fer (Updegrave *et al.*, 2015).

1.4.3 Chez les bactéries à Gram positif

Chez les bactéries à Gram positif, la régulation et la fonction de Hfq sont peu connues et caractérisées. Il est également décrit que chez ces bactéries, les petits ARNs régulateurs ne dépendent pas de Hfq pour réguler les gènes comme c'est le cas chez les Gram négatif (Bouloc et Repoila, 2016). De plus, la RNase E qui fait partie du dégradosome se lie à Hfq chez les bactéries à Gram négatif n'est pas présente chez les Gram positif. Hfq ne participe également

pas beaucoup à la régulation de la traduction des ARNm (Murina et Nikulin, 2016). Enfin, chez les bactéries à Gram négatif, il existe une région riche en arginine au site de liaison d'Hfq par les petits ARNs régulateurs qui est très bien conservée, mais les résidus arginines sont presque absents chez les Gram positif (Updegrave *et al.*, 2016).

1.4.3.1 Exemple *Staphylococcus aureus*

La chaperonne Hfq n'a pas été très étudiée chez *Staphylococcus aureus* et son rôle est peu connu. La délétion d'*hfq* n'affecte pas la croissance dans près de deux mille conditions de croissance testées (Bouloc et Repoila, 2016). Cependant, cette délétion provoque une altération de la réponse au stress et de la virulence (Boudry *et al.*, 2014). Enfin, *S. aureus* encode pour plusieurs petits ARNs régulateurs, mais ceux-ci ne sont pas Hfq-dépendants. Par exemple, le petit ARN régulateur RNAIII perturbe une tige boucle du RBS de l'ARNm de *hla*, sans avoir recourt à Hfq, ce qui mène à une expression de l' α -toxine (Fröhlich et Vogel, 2009).

1.4.4 Hfq chez *Bacillus subtilis*

Comme pour *S. aureus*, la chaperonne Hfq chez *Bacillus subtilis* a un rôle très peu compris et aucune étude ne s'entend clairement sur son implication. La délétion d'*hfq* ne semble avoir aucun impact sur la croissance. Cependant, lors de la transition entre la phase exponentielle et la phase stationnaire de croissance, une augmentation des niveaux cellulaires de la protéine Hfq est décelée. Donc, Hfq pourrait avoir une fonction spécialisée lorsque les nutriments sont limitants, par exemple lors de la phase stationnaire de croissance (Rochat *et al.*, 2015). La délétion d'*hfq* a aussi un impact négatif sur les gènes impliqués dans la chimiotaxie et la motilité (Jagtap *et al.*, 2016). Une étude de transcriptomique réalisée par Hämmerle *et al.* (2014) démontre qu'une grande quantité d'ARNm est perturbée par la délétion d'*hfq*. Une plus grande abondance de gènes impliqués dans le système de type I toxine-antitoxine, la respiration aérobie et anaérobie, la sporulation et la compétence ont été trouvées.

Aussi, il semble exister un sous-ensemble de petits ARNs régulateurs capable de s'associer à Hfq. Une étude de Dambach *et al.* (2013) a démontré que Hfq est en mesure de co-immunoprécipiter avec plusieurs ARNm dont celui de la sous-unité A de la surfactine synthétase (*srfAA*). Bien qu'intéressantes, ces études ne permettent pas d'avoir une idée claire de la fonction d'Hfq chez *B. subtilis*.

Les travaux de Jagtap *et al.* (2016) ont mis en évidence que l'ARNm d'*hfq* pouvait être un transcrit monocistronique ou polycistronique. Dans le second cas, *hfq* serait en opéron (*ymaF-miaA-hfq*) avec les gènes *miaA*, une enzyme de modification des ARN de transfert (ARNt), et *ymaF*, qui a une fonction inconnue. Le transcrit polycistronique avec un promoteur en amont du gène *ymaF* est dépendant du facteur de transcription σ^B lors de stress cellulaire. Le transcrit monocistronique est dépendant du facteur de transcription σ^H lors de la transition en phase de croissance (Jagtap *et al.*, 2016).

Selon les études effectuées chez les bactéries à Gram négatif, la capacité d'Hfq à s'apparier aux petits ARNs régulateurs corrèle avec le nombre d'arginine présentes dans une région semi-conservée sur l'hexamère. Chez *B. subtilis*, un seul résidu arginine est présent, ce qui offre peu d'activité de liaison comparée aux bactéries à Gram négatif (Zheng *et al.*, 2016). Des études de cristallographie ont permis de déterminer que chez *B. subtilis*, les ARNs se lient à la face distale de l'hexamère avec une interaction spécifique sur une arginine (Someya *et al.*, 2012). Cette liaison avec Hfq se ferait via une séquence répétée A/G présente sur les ARNs de *B. subtilis* (Baba *et al.*, 2010).

1.5 Hypothèse et objectifs de maîtrise

Étant donné que les biofilms sont ubiquitaires dans l'environnement et ont plusieurs implications, il est important de comprendre les voies cellulaires impliquées dans leur

formation. Il pourra ainsi être plus facile de traiter ces biofilms pour qu'ils ne soient pas nocifs pour la société ou bien pour être en mesure d'en tirer profit en agriculture.

La formation du biofilm bactérien chez *Bacillus subtilis* est régulée principalement par la voie de signalisation Spo0A qui mène à la production de matrice extracellulaire, principale composante du biofilm. Il a été démontré que le niveau d'ARNm de certains gènes présents dans cette voie de signalisation pouvait affecter la formation de biofilm. Le niveau d'ARNm de ces gènes peut être, entre autres, régulé par la chaperonne d'ARN Hfq. Chez les bactéries à Gram négatif, Hfq est caractérisée comme ayant un rôle dans la régulation post-transcriptionnelle des gènes. Cependant, chez les bactéries à Gram positif comme *B. subtilis*, le rôle de la protéine Hfq est très peu connu et caractérisé. Chez *B. subtilis*, il a été démontré que Hfq pouvait lier certains ARNm comme celui de la surfactine, qui est un des signaux extracellulaires permettant la formation de biofilm (Dambach *et al.*, 2013). Donc, nous pouvons penser que Hfq chez *B. subtilis* pourrait avoir un rôle semblable à celui chez les bactéries à Gram négatif en régulant l'expression de certains gènes.

Mon hypothèse de recherche est donc que la protéine Hfq agirait sur la stabilité des ARNm de gènes qui influencent la formation de biofilm et la colonisation des racines de plantes. Cette hypothèse sera testée à l'aide de trois principaux objectifs. Premièrement, je caractériserai l'effet de la chaperonne d'ARN Hfq sur la formation de biofilm et la colonisation des racines de plante. Deuxièmement, je déterminerai l'effet de la chaperonne d'ARN sur différents gènes impliqués lors de la formation du biofilm. Finalement, je vérifierai si l'effet de Hfq sur le biofilm se fait via une influence de la traduction de l'ARNm de la surfactine.

CHAPITRE 2

MATÉRIEL ET MÉTHODES

2.1 Souches et milieux de culture

Lors de mes expériences au laboratoire, différentes souches de *Bacillus subtilis* ont été utilisées. Certaines souches sont spécifiques à des expériences en particulier puisqu'elles requièrent par exemple, l'utilisation d'une molécule fluorescente. Nous pouvons voir un résumé de ces souches dans le Tableau 1.

Tableau 1. Souches de *Bacillus subtilis* utilisées dans cette étude

Souche	Génotype	Utilisation
WT	3610	Contrôle négatif
LT2	3610 <i>amyE::P_{hyperspank}-hfq</i> (spec ^R)	Phénotype, qPCR
LT19	3610 <i>hfq::cat</i>	Phénotype
LT39	3610 <i>lacA::P_{tapA}-yfp</i> (mls ^R)	Cytométrie en flux, Microscopie
LT33	3610 <i>amyE::P_{hyperspank}-hfq lacA::P_{tapA}-yfp</i> (spec ^R , mls ^R)	Cytométrie en flux, Microscopie
LT21	3610 <i>hfq::cat lacA::P_{tapA}-yfp</i> (mls ^R)	Cytométrie en flux, Microscopie
JC95	3610 <i>amyE::P_{hyperspank}-ylmH lacA::P_{tapA}-yfp</i> (spec ^R , mls ^R)	Cytométrie en flux
JC96	3610 <i>amyE::P_{hyperspank}-yqeI lacA::P_{tapA}-yfp</i> (spec ^R , mls ^R)	Cytométrie en flux
JC97	3610 <i>amyE::P_{hyperspank}-ytpR lacA::P_{tapA}-yfp</i> (spec ^R , mls ^R)	Cytométrie en flux

Les mutants de délétion sont construits grâce à un « *Long flanking homology PCR* » qui permet de remplacer le gène cible par une cassette de résistance à un antibiotique. Pour obtenir une surproduction d'un gène, nous utilisons le promoteur *hyperspank*, qui est un promoteur fort inductible à l'IPTG. Dans cette étude, une quantité de 500 µM d'IPTG est utilisée lors de son induction. Ce promoteur fait partie du plasmide pDR111 où nos gènes d'intérêts sont clonés à la suite d'une digestion par les enzymes de restrictions NheI et SalI (Artale, 2014).

Les constructions obtenues sont ensuite transférées par compétence naturelle dans la souche de *B. subtilis* 168, qui est incapable de former du biofilm (Cutting *et al.*, 1990). Les constructions sont intégrées dans le génome par recombinaison homologue, ce qui consiste à intégrer un fragment d'ADN double brin par homologie de séquence dans le génome bactérien, au locus *amyE* ou *lacA* et sélectionnées avec les antibiotiques appropriés (Guérout-Fleury *et al.*, 1996 ; Härtl *et al.*, 2001). Par la suite, les constructions sont transduites dans une souche 3610 ou d'autres mutants appropriés de *B. subtilis* à la suite d'une transduction avec les phages SPP1 (Yasbin et Young, 1974).

Différents milieux de culture sont utilisés pour la croissance de *B. subtilis* en condition normale de croissance ou en condition de formation de biofilm. Le milieu LB (*Lysogeny Broth*) permet la croissance normale des bactéries sans la formation de biofilm. Il est utilisé pour la multiplication des bactéries en bouillon ou en boîte de Petri. Il est également possible d'ajouter des antibiotiques pour la sélection bactérienne comme la spectinomycine (100 µg/ml), le chloramphénicol (5 µg/ml) ou la mls (1 µg/ml d'érythromycine, 25 µg/ml de lincomycine).

Le milieu MSNg favorise la colonisation des racines de plante par *B. subtilis* (*minimal salts nitrogen glycerol* ; 5 mM Tampon phosphate de potassium, 0,1 M MOPS pH 7, 2 mM MgCl₂, 0,05 mM MnCl₂, 0,001 mM ZnCl₂, 0,002 mM thiamine, 0,2 % NH₄Cl, 0,05 % glycérol, 0,7 mM CaCl₂ avec 1,5 % agar).

Le milieu MSNc est un milieu minimal n'induisant pas ou peu le biofilm (*minimal salts nitrogen cellobiose* ; 5 mM Tampon phosphate de potassium, 0,1 M MOPS pH 7, 2 mM MgCl₂, 0,05 mM MnCl₂, 0,001 mM ZnCl₂, 0,002 mM thiamine, 0,2 % NH₄Cl, 0,7 mM CaCl₂, 0,5 % cellobiose et 1,5 % agar). Le milieu MSNc pectine est une variation du milieu MSNc, auquel est ajouté une concentration finale de 0,5 % pectine. Le milieu MSgg permet l'induction de la formation du biofilm grâce à l'ajout de certains composants (*minimal salts glutamate glycerol* ; 5 mM Tampon phosphate de potassium, 0,1 M MOPS pH 7, 0,05 mM FeCl₃, 2 mM MgCl₂, 0,05 mM MnCl₂, 0,001 mM ZnCl₂, 0,002 mM thiamine, 0,5 % glycérol, 0,5 % glutamate, 0,7 mM CaCl₂ avec 1,5 % agar).

2.2 Phénotype des biofilms sur milieu gélosé

Les souches WT, LT2 et LT19 sont inoculées dans 3 ml de bouillon LB et incubées avec rotation pendant 3 h à 37 °C. La densité optique à 600 nm doit être ajusté à 1 avec du LB. Ensuite, l'inoculation des différents milieux de culture est effectuée en déposant 2 µl de culture en forme de petite goutte sur les boîtes de Petri MSNc, MSNc pectine ou MSgg agar contenant ou non de l'IPTG. Les boîtes de Petri sont incubées à 30 °C durant 72 h et les photos sont prises à l'aide d'un appareil photo Nikon.

2.3 Cytométrie en flux

2.3.1 Fixation des biofilms

Les biofilms sont inoculés de la même manière que dans la section 2.2 sur boîtes de Petri MSNc, MSNc pectine et MSgg agar avec ou sans IPTG et incubés pendant 16 h à 30 °C. Les souches utilisées sont WT, LT39, LT33, LT21, JC95, JC96 et JC97. Les biofilms sont grattés délicatement de la boîte de Petri pour éviter de récolter de l'agar et resuspendus dans 500 µl de

PBS 1X. Les échantillons sont centrifugés 1 min. à vitesse maximale et le surnageant est retiré. Ensuite, les cellules sont resuspendues dans 200 µl de paraformaldéhyde (PF) 4 % et incubées 7 min. à la température de la pièce. Enfin, centrifuger 1 min. à vitesse maximale et retirer le PF sans perturber le culot puis laver les cellules 2 fois avec 500 µl de PBS 1X. Le culot est ensuite, resuspendu dans 500 µl de GTE (50 mM glucose, 10 mM EDTA et 20 mM Tris pH8) puis entreposé à 4 °C pour une analyse ultérieure.

2.3.2 Analyse au cytomètre en flux

Avant l'analyse, les échantillons sont soniqués (Qsonica sonicators, sonde CL-18 ; amplitude de 30 % en appliquant 10 pulsations de 1 sec. avec 1 sec. de pause entre chacun) afin de dissocier toutes les cellules du biofilm. Par la suite, celles-ci sont diluées dans du PBS 1X avant l'analyse afin d'atteindre un maximum de 1000 évènements/seconde lors de l'acquisition des données.

Les échantillons sont analysés à l'aide du BD FACSJazz (BD Biosciences) en utilisant un laser à 488 nm. Pour chaque échantillon, au moins 20 000 évènements sont mesurés et l'acquisition des données est réalisée avec le logiciel BDFacs software 1.2.0.142. Les populations bactériennes sont déterminées en utilisant des limitations FSC/SSC et ensuite, les populations bactériennes fluorescentes sont déterminées en utilisant des limitations FSC/542/27[488]. L'analyse des données est réalisée directement avec le logiciel d'acquisition ou bien avec le logiciel FCD Express 6 Flow Research Edition. Les analyses statistiques sont réalisées avec le logiciel GraphPad Prism 7 et la comparaison des données est faite en utilisant le test de student.

2.4 Colonisation des racines d'*Arabidopsis thaliana*

2.4.1 Croissance des plantules d'*Arabidopsis thaliana*

Dans notre étude, la plante modèle *Arabidopsis thaliana* écotype Col-0 est utilisée puisque sa croissance est très rapide. Les plantes sont utilisées lorsqu'elles ont six jours de croissance. Avant leur inoculation sur gélose, les graines sont stérilisées. Brièvement, elles sont incubées 5 min. dans de l'eau non stérile avec rotation, suivit de 5 min. dans de l'éthanol 70 % puis 10 min. dans de l'eau de Javel 5 % avec rotation. Ensuite, les graines sont lavées trois fois pendant 2 min. dans de l'eau stérile, toujours avec rotation. Finalement, les graines sont plantées une à une à l'aide d'une pipette P20 réglée à 2 µl sur un milieu MS (*Murashige-Skoog*).

Les graines doivent être assez séparées sur le Petri pour éviter qu'elles ne se touchent pendant leurs croissances. Enfin, les Petri sont scellés avec du parafilm et incubés durant 6 jours dans la chambre de croissance pour les plantes. Cette chambre de croissance comporte un cycle de jour de 12 h à 25 °C et un cycle de nuit de 12 h à 20 °C.

2.4.2 Croissance des bactéries

Une précroissance des souches WT, LT39, LT33 et LT21 est effectuée dans 3 ml de bouillon LB et incubé avec rotation pendant 3 h à 37 °C. Les bactéries vont êtreensemencés à une DO₆₀₀ de 0,02 dans une plaque 48 puits contenant 300 µl de milieu MSNg. Une plantule est ensuite ajoutée à chacun des puits et le couvercle de la plaque est fixé avec du parafilm. Finalement, la plaque est incubée sans agitation dans la chambre de croissance pour les plantes pendant 16 h.

2.4.3 Microscopie à fluorescence

La microscopie se fait à l'aide du microscope inversé à fluorescence Zeiss Axio Observer Z1 (Zeiss) avec des racines complètes de plantes colonisées par *B. subtilis*. L'acquisition des données est réalisée avec le logiciel Zeiss Zen. Les images de racines entières ont été prises avec un objectif 20X et à 40X pour les simples images en regardant la présence du fluorophore Yfp (filtre d'excitation 500/20, filtre d'émission 535/30) sur la racine. Pour être en mesure de bien voir la délimitation de la racine, le canal DAPI (filtre d'excitation 365/100, filtre d'émission 445/50) est utilisé ce qui nous permet de voir la racine en bleu, puisqu'elle émet naturellement de la fluorescence à cette longueur d'onde.

L'analyse des images de la racine est réalisée avec le serveur OMERO qui permet également de stocker toutes les images de microscopie. L'analyse de la racine entière est complétée par Daniel Garneau avec le logiciel Zeiss Zen et par la suite, avec le logiciel CellProfiler 2.2. Un algorithme de la plate-forme de microscopie a permis de quantifier le nombre de pixels fluorescents sur la racine en fonction de sa longueur. Les analyses statistiques sont réalisées avec le logiciel GraphPad Prism 7 et la comparaison des données est faite en utilisant le test de student.

2.5 PCR quantitative

2.5.1 Extraction d'ARN

Les biofilms sont inoculés de la même manière que dans la section 2.2 sur boîtes de Petri MSNc, MSNc pectine et MSgg agar avec ou sans IPTG et incubés pendant 12, 16 ou 24 h à 30 °C pour les souches WT ou LT2. L'extraction d'ARN se fait selon un protocole maison suivi d'un kit d'extraction *Quick-RNA MiniPrep* de Zymo Research.

D'abord, le biofilm est récolté en le grattant de la boîte de Petri et en le resuspendant dans 500 µl de PBS 1X. Puis, les cellules sont centrifugées, et resuspendues dans 500 µl de PBS 1X. Les échantillons sont ensuite soniqués à une amplitude de 30 % en appliquant 10 pulsations d'une seconde avec une seconde de pause pour désassembler complètement le biofilm. Par la suite, il faut ajouter immédiatement 500 µl de RNA later (25 mM citrate de sodium, 10 mM EDTA et 70 g sulfate d'ammonium ; pour 100 ml de solution à pH 5,2) et centrifuger à 13 000 RPM pendant 2 minutes. Il est possible de congeler le culot à -80 °C à cette étape. Le culot est ensuite lavé avec 500 µl de PBS 1X et centrifugé à 13 000 RPM pendant 2 min. puis resuspendu dans 500 µl de tampon TE contenant 15 mg/ml de lysozyme fraîchement préparé. L'incubation avec le lysozyme est effectuée pendant 10 min. à température pièce, puis 600 µl de tampon de lyse pour l'ARN provenant du kit *Quick-RNA MiniPrep* est ajouté aux échantillons. Des billes lavées à l'acide sont ajoutées dans des tubes de 2 ml avec un bouchon scellant (environ 25-50 mg de billes par tube), et l'échantillon est transféré dans ces mêmes tubes, qui sont ensuite vortexés pendant 2 minutes. À la suite d'une centrifugation de 2 min. à 13 000 RPM, le surnageant est transféré sur une colonne Spin-Away Filter pour purifier l'échantillon et éliminer l'ADN génomique (ADNg). À la suite d'une centrifugation de 1 min. à 12 000 RPM, l'éluat est conservé dans un tube Eppendorf de 1,5 ml.

Une deuxième étape de purification d'ARN est effectuée en ajoutant un volume d'éthanol 70 % aux échantillons, qui est ensuite mélangé par inversion. Le tout est transféré sur une colonne Zymo-Spin IIICG centrifugé 1 min. à 12 000 RPM et l'éluat est jeté. Ces étapes sont répétées pour le volume total de l'échantillon. L'échantillon présent sur la colonne est ensuite traité à la DNase I sur la colonne pour enlever les traces résiduelles d'ADNg. La colonne est prélavée avec 400 µl de RNA Wash Buffer et centrifugée 1 min. à 12 000 RPM. Puis, pour chaque échantillon le mélange de DNase I (5 µl DNase I et 75 µl de tampon de digestion) est préparé. 80 µl du réactif est déposé au centre de la colonne, puis incubé pendant 15 min. à température pièce et centrifugé 1 min. à 12 000 RPM.

Finalement, la colonne est lavée successivement avec 400 µl de RNA Prep Buffer, 700 µl de RNA Wash Buffer et 400 µl de RNA Wash Buffer. À la suite d'un transfert dans un nouveau tube Eppendorf, 50 µl d'eau dépourvu de DNase/RNase est déposé directement au centre de la colonne, et élué par centrifugation. L'ARN peut être utilisé immédiatement ou bien être entreposé à -80 °C. L'ARN est finalement dosé au nanodrop, et soumis à une migration sur gel d'agarose pour s'assurer de sa qualité.

2.5.2 Transcription inverse

Une étape de transcription inverse est effectuée sur l'ARN pour obtenir de l'ADN complémentaire (ADNc) avec le kit *iScript cDNA Synthesis* de BioRad. Chaque échantillon est préparé à l'aide de la recette suivante : 4 µl du iScript Reaction Mix 5X, 1 µl de la Reverse Transcriptase, 1 µg d'ARN total et de l'eau dépourvu de nucléase pour compléter le volume à 20 µl. Le cycle transcription inverse est le suivant : 5 min. à 25 °C pour l'appariement, 20 min. à 46 °C pour la transcription inverse et 1 min. à 95 °C pour l'inactivation de l'enzyme. Finalement, ajouter 130 µl d'eau dépourvu de nucléase aux réactions pour 150 µl de volume total. Alors, l'échantillon d'ADNc est dilué et prêt pour son utilisation au qPCR.

2.5.3 qPCR

Chacune des paires d'amorces utilisées pour le qPCR (Tableau 2) a été conçue traditionnellement sans l'aide d'un logiciel puisque *B. subtilis* est un organisme qui a un génome variable selon les régions en pourcentage de GC. Alors, il est très difficile d'obtenir des amorces standard pour certaines régions du génome avec un logiciel spécialisé.

Une courbe d'efficacité a été effectuée pour chacune des paires d'amorces utilisées avant de commencer les analyses en qPCR, afin de vérifier si elles peuvent amplifier efficacement le gène cible peu importe sa concentration de départ dans l'échantillon.

D'abord, un fragment matrice est produit à l'aide d'un PCR standard avec chaque paire d'amorces, et ce fragment est purifié à l'aide du *PCR Cleanup Protocol* du kit *GenepHlow Gel/PCR* de Geneaid. Ensuite, le fragment d'ADN est dosé au nanodrop pour s'assurer de sa pureté et de son intégrité. Puis, des dilutions en série 1 : 10 sont effectuées pour obtenir des concentrations d'ADN 10^{-4} , 10^{-6} , 10^{-8} et 10^{-10} .

Une analyse normale en qPCR (détails plus bas) nous permet d'obtenir des courbes d'efficacité (Annexe 1), avec lesquelles sont calculés un facteur d'amplification et une efficacité. Ce calcul est réalisé avec le calculateur en ligne *qPCR Efficiency Calculator* de ThermoFisher Scientific grâce à la pente de la courbe obtenue.

Tableau 2. Amorces utilisées pour les analyses en qPCR

Gènes	Amorces
<i>defA</i>	F 5' AAATGGATGGTGTCTGGACTGGC 3'
	R 5' CGGTTTGCTCGCCGCTTTTTT 3'
<i>hfq</i>	F 5' GTTTTTTTGCTGAACGGCTTTCAG 3'
	R 5' TGCTGCTTACCTTCCGATTCCAA 3'
<i>sinI</i>	F 5' TGGGTGAATTAATGGTGGGAAGCC 3'
	R 5' GGACCAGGATGAGCAGACTTTTT 3'
<i>sinR</i>	F 5' GAAAAAGTCTCCGCTGTTCTGGAC 3'
	R 5' ATCGCATCGGAACCAATTTCTC 3'
<i>srfAA</i> 5' UTR	F 5' TCTTATTAGGGTGGGGTCTTGCG 3'
	R 5' CAGATGGCCGCTATTAAAGCAGG 3'
<i>srfAA</i> fin	F 5' AAGATGTGGCGTTCTCGATTGAGC 3'
	R 5' TGTCCTGATGGCAGCTCTGATCT 3'

F : forward équivalent à sens, R : reverse équivalent à anti-sens

Le facteur d'amplification ainsi calculé doit être d'environ 2 puisqu'il provient du chiffre théorique de la formule $2^{-\Delta\Delta C_t}$ nécessaire pour le calcul du qPCR. L'efficacité, quant à elle, doit se situer entre 90 et 110 %. Comme vous pouvez le voir à l'annexe 1, toutes les courbes effectuées ont de bonnes efficacités sauf celles pour les amorces des gènes *sinR* et *srfAA* 5' UTR. Il est possible qu'une mauvaise calibration des pipettes du laboratoire lors de la préparation des dilutions en série explique ce problème.

À la suite de ces tests préliminaires, nous pouvons réaliser le qPCR pour le gène *defA*, choisi comme gène de référence et pour les gènes *hfq*, *sinI*, *sinR*, *srfAA* 5' UTR et *srfAA* fin à analyser dans cette étude (Tableau 3). Nous utilisons le kit pour *qPCR EvaGreen 2X qPCR MasterMix* d'ABM pour nos analyses. Pour chaque échantillon, le mélange suivant (volume final de 20 µl) est réalisé : 10 µl de *EvaGreen 2X qPCR MasterMix*, 0,6 µl d'amorce sens à 10 µM, 0,6 µl d'amorce anti-sens à 10 µM, 2 µl d'ADNc et 6,8 µl d'eau dépourvu de nucléase.

Tableau 3. Gènes analysés au qPCR

Gènes	Rôle	Fonction
<i>defA</i>	Formylméthionine déformylase	Traduction
<i>hfq</i>	Chaperonne d'ARN	Non connue
<i>sinI</i>	Antagoniste de SinR	Contrôle de la formation du biofilm
<i>sinR</i>	Régulateur transcriptionnel	Contrôle de la formation du biofilm
<i>srfAA</i> 5' UTR	Surfactine synthétase / compétence	Synthèse d'antibiotique
<i>srfAA</i> fin	Surfactine synthétase / compétence	Synthèse d'antibiotique

Le cycle de qPCR utilisé est le suivant : 10 min. à 95 °C pour l'activation de l'enzyme, 15 sec. à 95 °C pour la dénaturation, 30 sec. à 60 °C pour l'appariement le tout pour 35 cycles. Une courbe de dissociation complète ce cycle selon les recommandations du qPCR utilisé. Les réactions de qPCR sont effectuées sur un appareil Mx300P de Stratagene et analysées avec le logiciel MxPro 4.10. Les calculs d'expression relative soit le $2^{-\Delta\Delta Ct}$ sont effectués à l'aide des Ct obtenus lors du qPCR. Le signe Delta Ct (ΔCt) représente le Ct du gène à analyser - le Ct du gène contrôle. Les analyses statistiques sont réalisées avec le logiciel GraphPad Prism 7 et la comparaison des données est faite en utilisant l'analyse de la variance.

$$2 - ((\Delta Ct_{\text{échantillon}}) - (\Delta Ct_{\text{contrôle}}))$$

2.6 Cartographie de la région du 5' UTR du gène *srfAA*

La souche WT estensemencée dans un bouillon MSNc pectine de 3 ml incubé avec rotation pendant 4 à 5 h à 37 °C. La DO_{600} est prise à chaque heure pour pouvoir prélever les cellules vers le début de la phase stationnaire de croissance ou l'expression du gène *srfAA* est élevée (Comella et Grossman, 2005). L'extraction d'ARN est réalisée sur l'ensemble des bouillons de culture comme décrit à la section 2.5.1 afin d'obtenir une grande quantité d'ARN. Un kit *TURBO DNA-free* d'Invitrogen permet ensuite d'enlever tout ADNg de l'échantillon. Pour ce faire, un volume équivalent à 20 µg d'ARN est utilisé, auquel est ajouté 2 µl de tampon Turbo DNase 10X, 1 µl de Turbo DNase, puis le volume de la réaction est complété à 20 µl avec de l'eau dépourvu de nucléase. Le tout est incubé à 37 °C pendant 30 min., puis 2 µl de DNase Inactivation Reagent est ajouté et incubé 5 min. à température pièce. La réaction est ensuite centrifugée 2 min. à 12 000 RPM et le surnageant est récupéré. L'ARN maintenant purifié va subir une étape de transcription inverse comme décrite à la section 2.5.2.

Tableau 4. Amorces utilisées lors de la cartographie de la région du 5' UTR de *srfAA*

Numéro	Nom	Amorces	PCR	Fragment
1	Anti-sens #1	5' TCAAGGAAACAAGTTCAGGCACC 3'	-	-
2	Sens #1	5' ATTAGCGAGTATCGGCCTGTTGA 3'	1,2	409 pb
3	Sens #2	5' GCTGATGCGATTGATTATGTGCTTG 3'	1,3	523 pb
4	Sens #3	5' CCCTTTAACGGATGCACAAAACG 3'	1,4	620 pb
5	Sens #4	5' AATGCGTTGCACATGTTCACTGC 3'	1,5	688 pb
6	Anti-sens #2	5' GCAGTGAACATGTGCAACGCATT 3'	-	-
7	Sens #4,1	5' CGGCTGTTAGTTCATAAGAATTAA 3'	6,7	72 pb
8	Sens #4,2	5' GCTTTTTAAGTGTAGTACTTTGGG 3'	6,8	102 pb
9	Sens #4,3	5' CCATCTGTTTTTTGATTGGAAGC 3'	6,9	128 pb
10	Sens #4,4	5' ACTGACGGCAGCCTGCTTTAATA 3'	6,10	155 pb
11	Sens #5	5' ACTGACGGCAGCCTGCTTTAATA 3'	1,11	820 pb
12	Sens #6	5' GGTTCCTTATTAGGGTGGGGTCTTG 3'	1,12	882 pb
13	Sens #7	5' GAAACTTTTCACCCATTTTTCGGTG 3'	1,13	985 pb

Suite à la réaction de RT, des PCR standards sont réalisés sur le gène de la sous-unité A de la surfactine synthétase (*srfAA*), qui lie la chaperonne d'ARN Hfq (Dambach *et al.*, 2013), avec les composants suivants : 5 µl d'amorce sens (Tableau 4, la colonne PCR désigne les numéros des amorces utilisées pour faire ce PCR et le fragment en pb qui en résulte) à 20 µM, 5 µl d'amorce anti-sens à 20 µM, 4 µl d'ADNc ou 2 µl d'ARN total purifié comme contrôle négatif, 10 µl de tampon Phusion 5X, 5 µl de dNTPs 2 mM, 0,5 µl de Phusion (NEB) et le volume d'eau milli-Q nécessaire pour compléter le volume à 50 µl.

À la suite d'une dénaturation initiale à 98 °C pendant 3 min., le programme PCR effectuée 35 cycles comportant ces trois prochaines étapes : dénaturation à 98 °C pendant 10 sec., hybridation à 46 °C ou 51 °C pendant 20 sec. et élongation à 72 °C pendant 15 secondes. Une élongation finale à 72 °C pendant 5 min. est effectuée. L'appareil utilisé est un thermocycleur modèle T100 de BioRad. Les réactions PCR (10 µl) sont ensuite migrées sur gel d'agarose de 1,5 ou 2 % avec un marqueur de poids moléculaire de 100 pb.

CHAPITRE 3

RÉSULTATS

3.1 Caractérisation de l'effet de la chaperonne d'ARN Hfq sur la formation de biofilm et la colonisation des racines de plante

3.1.1 Caractérisation de l'effet d'Hfq sur la formation de biofilm

La caractérisation de l'effet d'Hfq sur la formation de biofilm a été réalisée grâce à des essais de formation de colonies sur divers milieux gélosés induisant ou non le biofilm de *B. subtilis*. Cette technique acceptée dans la littérature permet de simuler en laboratoire la formation de biofilm et d'évaluer les différences phénotypiques du biofilm entre diverses souches.

Lors de l'essai de formation de colonies sur milieux gélosés, il est important de regarder la différence entre la souche LT2 non induite et induite, qui représente la surproduction de la protéine Hfq, pour les différents milieux de culture. Il est possible de constater que la surproduction de la protéine Hfq provoque un changement de phénotype comparé à la souche non induite sur MSgg. Ce changement semble aussi être présent lorsque le milieu contient des polysaccharides de plantes comme la pectine. Cependant, on peut constater que la délétion d'*hfq* ne semble pas mener à une différence phénotypique des colonies (Figure 5).

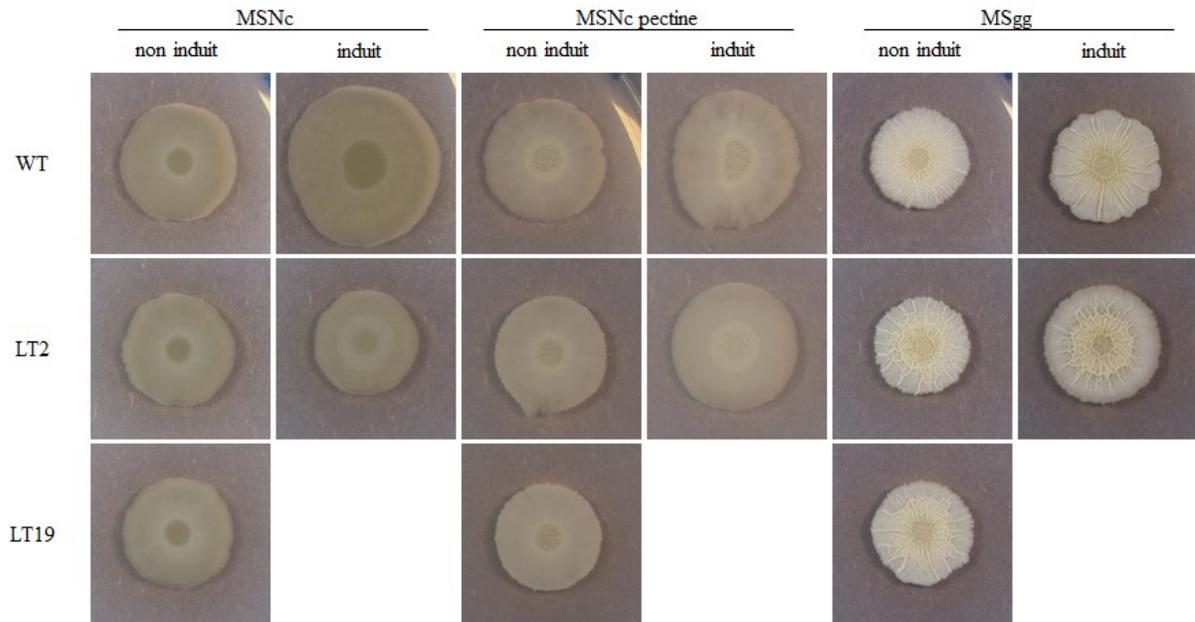


Figure 5. Phénotype des biofilms sur milieux gélosés. Photographie de colonies sur milieux gélosés après 72 h de croissance. Contrôle (WT), surproduction de la protéine Hfq non induite ou induite avec 500 μ M d'IPTG (LT2), délétion d'*hfq* (LT19).

3.1.1.1 Expression de la matrice extracellulaire

L'essai de formation de biofilm a révélé que la surproduction de la protéine Hfq provoque un changement dans le phénotype des colonies. Alors, il faut se demander si ce changement phénotypique est dû à une augmentation de la formation de biofilm et donc, qu'une plus grande partie des cellules produisent de la matrice extracellulaire, un composant majeur du biofilm. Pour ce faire, une analyse en cytométrie en flux est réalisée pour observer l'activation du promoteur de *tapA* fusionné au gène encodant pour la protéine fluorescente Yfp (reporteur P_{tapA} -*yfp*). Ce promoteur fait partie de l'opéron *tapA* qui voit sa transcription activée lors de la formation de biofilm. Ainsi, la proportion de cellules fluorescentes évaluée par cytométrie en

flux représente la proportion de cellules exprimant la matrice extracellulaire, et donc formant du biofilm.

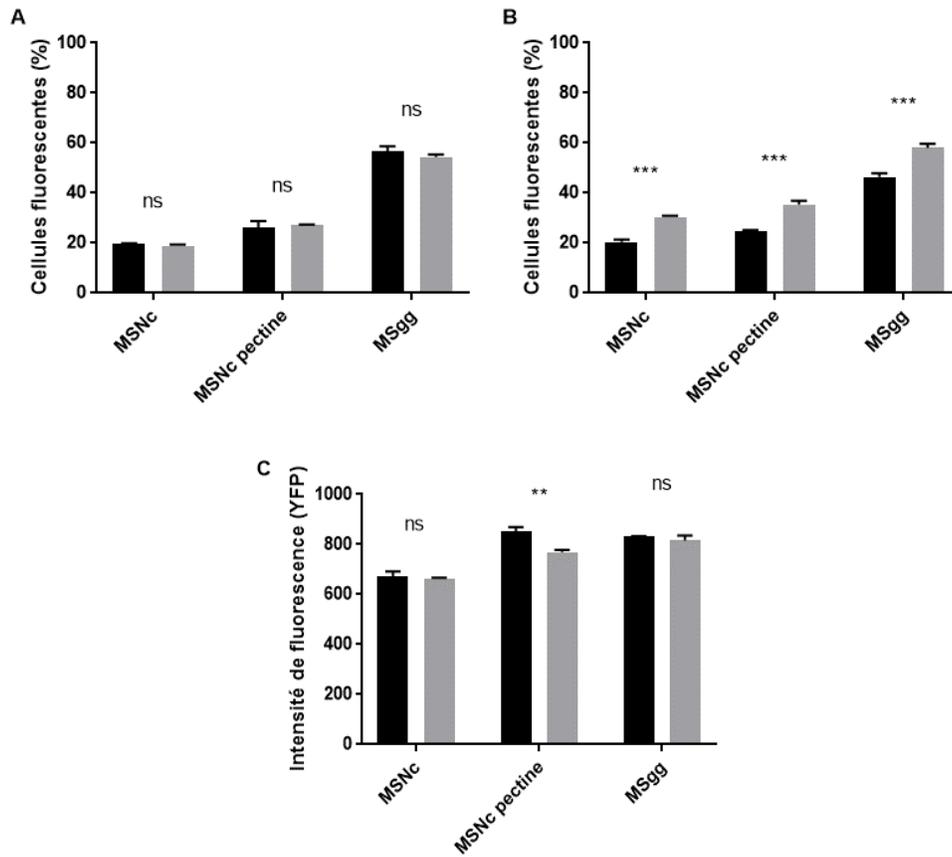


Figure 6. Expression de la matrice extracellulaire. Essai de cytométrie en flux représentant le pourcentage de cellules fluorescentes exprimant le reporteur P_{tapA} - yfp (A, B) ou l'intensité de fluorescence (C) lors de la formation de biofilm après 16 h de croissance. La comparaison des données est réalisée en utilisant le test de student (ns $P \geq 0,05$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$) **A**) comparaison entre la souche contrôle (WT, noir) et la délétion d' hfq (LT19, gris) **B**) comparaison entre la souche de surproduction de la protéine Hfq non induite (noir) ou induite avec 500 μM d'IPTG (gris) (LT2) **C**) intensité moyenne de la fluorescence des cellules fluorescentes lors de la surproduction de la protéine Hfq non induite (noir) ou induite avec 500 μM d'IPTG (gris) (LT2).

Chacun des trois milieux de culture utilisés induit la formation de biofilm ; MSgg étant le plus fort inducteur et MSNc, le plus faible. Donc, le pourcentage de cellules fluorescentes est plus élevé pour le milieu de culture MSgg (Figure 6A, B). Tout d'abord, nous pouvons observer que la délétion d'*hfq* ne provoque pas de changement significatif dans la formation de biofilm (Figure 6A). Cependant, lorsque la surproduction de la protéine Hfq est induite, il y a une augmentation significative de la formation de biofilm pour les trois milieux de culture (Figure 6B). De plus, l'intensité de fluorescence moyenne des cellules fluorescentes lors de la surproduction de la protéine Hfq a été mesurée. Il est possible de constater que l'intensité de la fluorescence des cellules en milieu MSNc pectine est moindre lors de la surproduction de la protéine Hfq (Figure 6C). Toutefois, il y a tout de même un plus grand pourcentage de cellules qui produisent de la matrice. Les cellules dont la formation de biofilm est induite par la pectine comparée au milieu MSgg ne produisent pas aussi intensément de la matrice lorsque la protéine Hfq est en surproduction. Donc, la protéine Hfq pourrait être impliquée dans la voie de signalisation menant à la formation de biofilm via une induction par la pectine selon un autre mécanisme que celui du milieu MSgg.

Puisque la délétion d'*hfq* n'apporte aucun changement dans la formation de biofilm, il est possible qu'une autre protéine puisse compenser l'absence d'Hfq via une redondance fonctionnelle. Ainsi, celle-ci pourrait jouer un rôle assez semblable à celui d'Hfq. Nous avons donc construit trois souches, contenant le reporteur fluorescent P_{iapA} -*yfp* permettant la surproduction des gènes *ylmH*, *yqeI* et *ytpR* en présence d'IPTG pour évaluer si un ou plusieurs d'entre eux auraient le même effet qu'Hfq. Ces gènes ont été choisis puisqu'ils encodent pour des petites protéines liant possiblement l'ARN (Nicolas *et al.*, 2012). Par ailleurs, cette expérience nous permet d'évaluer la spécificité de l'effet de la surproduction de la protéine Hfq sur la production de biofilm.

Tel que montré dans la figure 7, la surproduction des gènes *ylmH*, *yqeI* et *ytpR* ne change pas significativement le pourcentage de cellules qui produisent de la matrice. Seule la surproduction du gène *ylmH* en milieu de culture MSNc démontre une différence significative (Figure 7).

Nous pouvons conclure que l'augmentation du nombre de cellules qui produisent de la matrice extracellulaire est réellement due à la surproduction de la protéine Hfq et non à la simple surproduction d'une protéine. Aussi, nous avons pu constater qu'il ne semble pas y avoir de redondance fonctionnelle d'Hfq puisque les trois autres protéines ne présentent globalement aucun changement significatif.

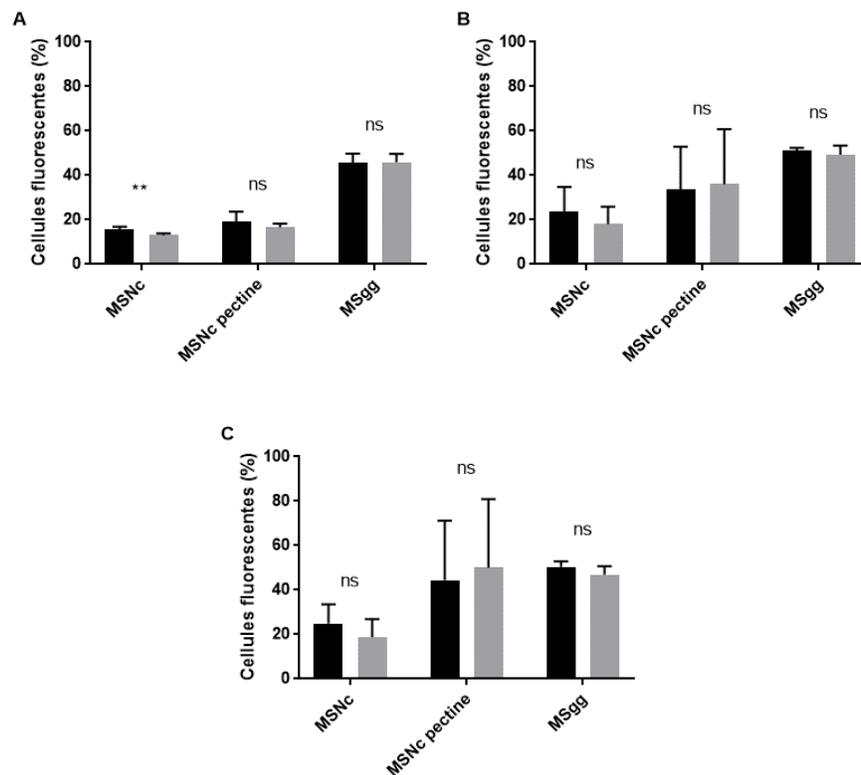


Figure 7. Contrôle de la spécificité de l'effet de la surproduction de la protéine Hfq. Essai de cytométrie en flux représentant le pourcentage de cellules fluorescentes exprimant le reporteur P_{lapA} - yfp lors de la formation de biofilm après 16 h de croissance. La comparaison des données est réalisée en utilisant le test de student (ns $P \geq 0,05$; ** $P < 0,01$) **A**) comparaison entre la souche de surproduction de $ytmH$ non induite (noir) ou induite avec 500 μ M d'IPTG (gris) (JC95) **B**) comparaison entre la souche de surproduction de $yqeI$ non induite (noir) ou induite avec 500 μ M d'IPTG (gris) (JC96) **C**) comparaison entre la souche de surproduction de $ytpR$ non induite (noir) ou induite avec 500 μ M d'IPTG (gris) (JC97).

3.1.2 Caractérisation de l'effet d'Hfq sur la colonisation des racines de plante

Des résultats préliminaires obtenus avant mon arrivé au laboratoire suggéraient que la souche surproduisant Hfq coloniserait les racines d'*Arabidopsis thaliana* plus efficacement comparée à une souche sauvage. De plus, la littérature démontre que la délétion d'*hfq* peut avoir un rôle négatif sur l'expression des gènes impliqués dans la motilité et la chimiotaxie des cellules (Jagtap *et al.*, 2016). Ainsi, j'ai voulu reproduire et confirmer ces résultats en caractérisant l'effet de la surproduction de la protéine Hfq à l'aide des essais de colonisation des racines d'*A. thaliana* avec *B. subtilis*. Ces essais sont observés par microscopie à fluorescence, puisque les souches contiennent le reporteur fluorescent P_{tapA} -*yfp*.

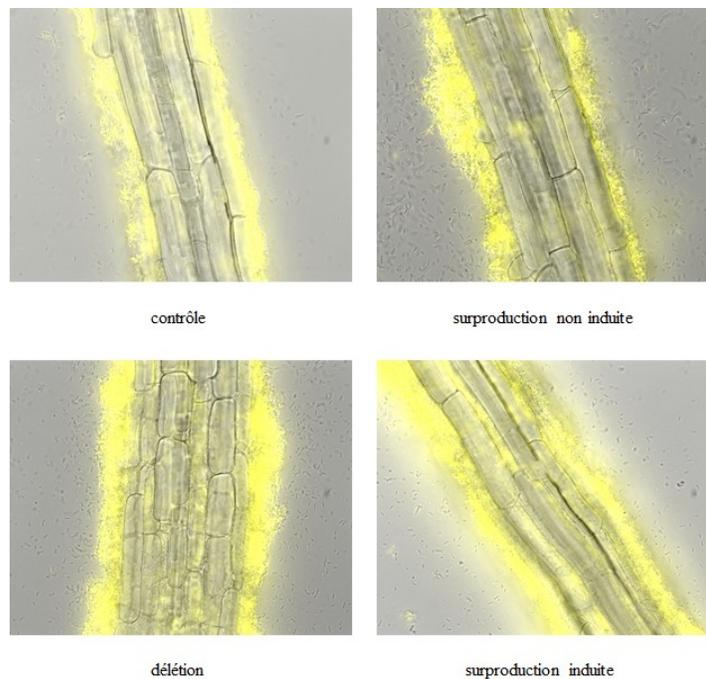


Figure 8. Colonisation des racines d'*Arabidopsis thaliana* par *Bacillus subtilis*. Microscopie à fluorescence des racines d'*A. thaliana* colonisées par *B. subtilis* exprimant le reporteur fluorescent Yfp (P_{tapA} -*yfp*) après 16 h. contrôle (LT39), délétion d'*hfq* (LT21), surproduction de la protéine Hfq non induite ou induite avec 500 μ M d'IPTG (LT33).

Une analyse qualitative nous suggérait que les racines d'*A. thaliana* étaient plus colonisées avec une souche qui surproduit Hfq et que cette colonisation est uniforme sur toute la racine. Par ailleurs, il semble aussi que la délétion d'*hfq* n'entraîne aucun phénotype particulier lors de la colonisation des racines de plantes comparées au contrôle (Figure 8). Afin de valider ces observations, nous avons quantifié cette colonisation sur les racines en analysant les images représentant la racine au complet, obtenues par une technique qui permet de prendre plusieurs petites photos au microscope inversé à fluorescence. Les images furent ensuite analysées pour déterminer le niveau de fluorescence, correspondant aux cellules qui expriment une des protéines de la matrice extracellulaire (TapA), en fonction de la longueur de la racine.

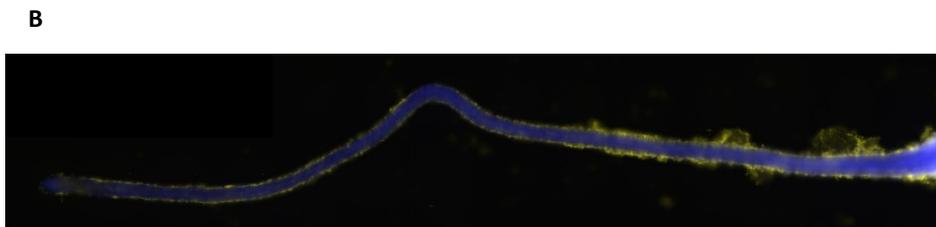
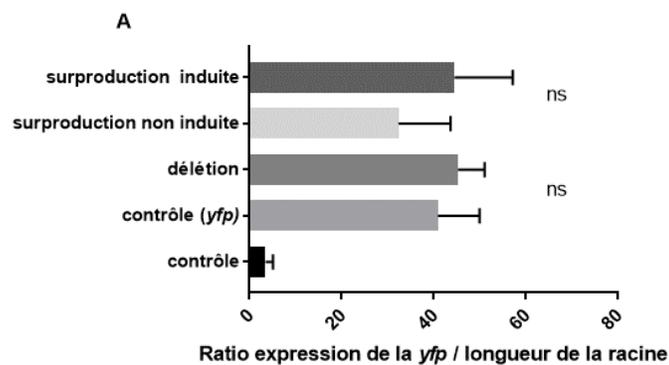


Figure 9. Niveau de colonisation des racines d'*Arabidopsis thaliana* par *Bacillus subtilis*.

Microscopie à fluorescence des racines d'*A. thaliana* colonisées par *B. subtilis* exprimant le reporteur fluorescent Yfp (P_{tapA} -yfp) après 16 h. La comparaison des données est faite en utilisant le test de student (ns $P \geq 0,05$). **A**) contrôle (WT et LT39), délétion d'*hfq* (LT21), surproduction de la protéine Hfq non induite ou induite avec 500 μ M d'IPTG (LT33) **B**) image d'une racine complète (LT39, le haut de la racine est à droite).

Grâce à la quantification de fluorescence, nous avons observé que l'induction de la surproduction de la protéine Hfq ne change pas significativement le niveau global de colonisation comparativement à la souche non induite. Pour ce qui est de la délétion d'*hfq*, elle ne démontre pas de changement significatif non plus. Ces résultats viennent donc contredire notre analyse subjective des résultats présentés à la figure 8, confirmant l'importance d'une analyse d'image pour ce type d'expérience (Figure 9).

3.2 Détermination de l'effet de la chaperonne d'ARN Hfq sur différents gènes impliqués lors de la formation de biofilm

Cette partie du projet va nous permettre de déterminer si la surproduction de la chaperonne d'ARN Hfq influence le niveau d'ARNm de différents gènes clés impliqués dans la voie de signalisation de la formation de biofilm. Pour ce faire, nous allons évaluer par RT-qPCR la quantité d'ARNm de différents gènes impliqués dans la formation du biofilm et connus pour être modulés au niveau de leur ARN, soit *sinI* et *sinR*.

3.2.1 Expression du gène *hfq* lors de la formation de biofilm

Tout d'abord, nous voulons observer l'expression relative du gène *hfq* dans le temps lorsque le biofilm est formé, afin d'examiner si l'expression d'*hfq* change à différents stades lors de la formation de biofilm.

Selon les résultats, il est possible de constater que l'expression relative de la chaperonne d'ARN Hfq est significativement plus élevée dans le milieu de culture MSgg relativement aux autres milieux de culture 12 h après l'inoculation pour former un biofilm. Cependant, 16 h et 24 h après l'inoculation l'expression relative du gène *hfq* reste non significative entre les différents milieux de culture (Figure 10).

Alors, nous pouvons affirmer que lorsque le biofilm commence sa croissance sur un milieu induisant la formation de biofilm le gène *hfq* est plus exprimé. Donc, les premiers stades de la formation de biofilm corrélerent avec une augmentation significative de l'expression d'*hfq*.

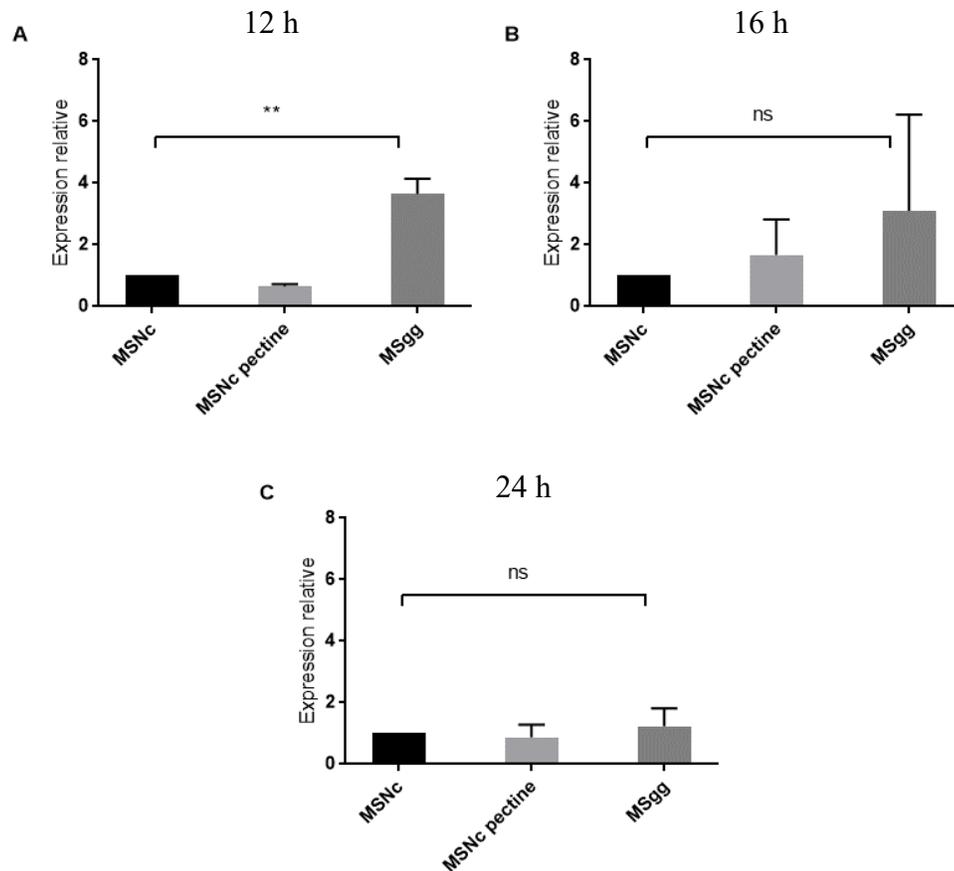


Figure 10. Expression relative du gène *hfq* dans le temps lors de la formation de biofilm. RT-qPCR du gène *hfq* pour la souche contrôle (WT). Expression relative normalisée sur le gène *defA*. La comparaison des données est réalisée en utilisant l'analyse de la variance (ns $P \geq 0,05$; ** $P < 0,01$). **A)** 12 h **B)** 16 h **C)** 24 h.

En parallèle, nous avons confirmé à l'aide d'un RT-qPCR sur l'ARNm d'*hfq* que nos constructions permettent la surproduction de ce gène. Les résultats ci-dessous démontrent qu'il

n'y a pas de différence significative lorsque le gène *hfq* est surproduit excepter à 24 h en milieu MSNc. Cependant, ce résultat est dû à une très grande variabilité entre les essais effectués. En considérant une seule expérience à la fois, nous pouvons observer une différence significative qui démontre que l'expression d'*hfq* est réellement surproduite dans nos constructions surproduisant Hfq (Figure 11).

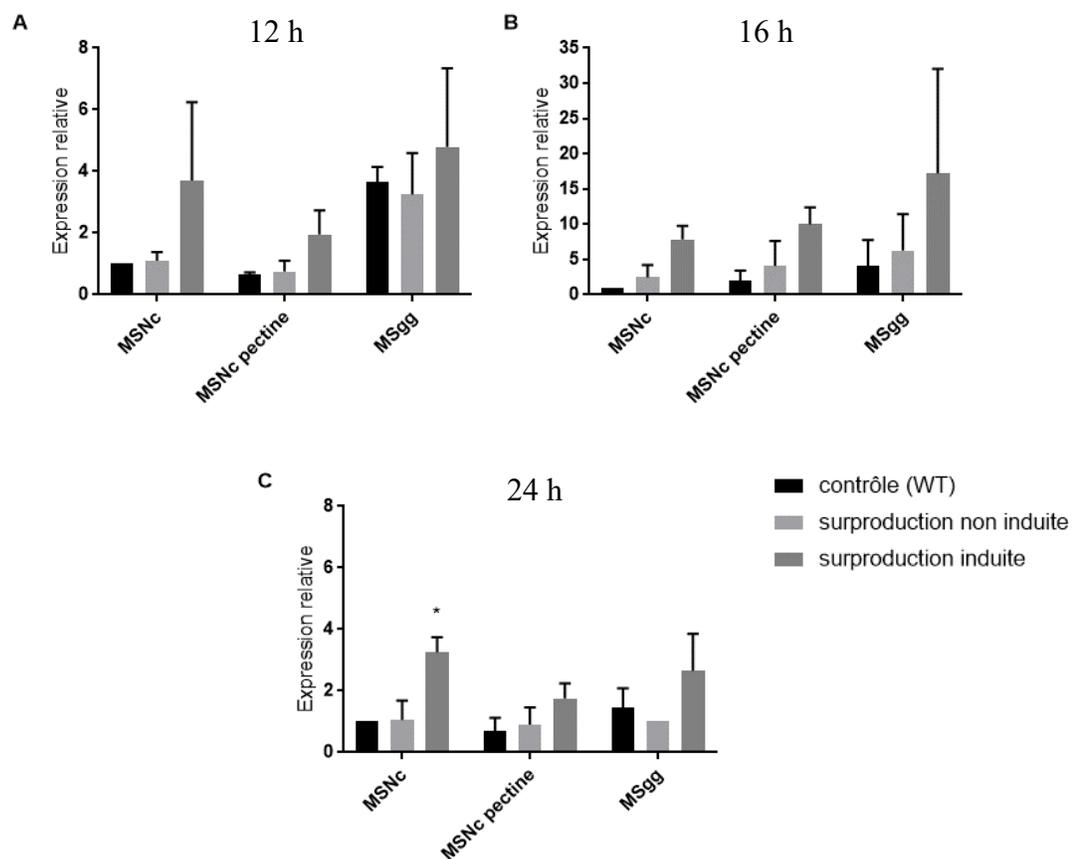


Figure 11. Vérification de la surproduction de la protéine Hfq dans le temps lors de la formation de biofilm. RT-qPCR du gène *hfq* pour les souches contrôle (WT, noir) et surproduction de la protéine Hfq non induite (gris pâle) ou induite (gris foncé) avec 500 μ M d'IPTG (LT2) dans le temps lors de la formation de biofilm. Expression relative normalisée sur le gène *defA*. La comparaison des données est réalisée en utilisant l'analyse de la variance (* P < 0,05). **A)** 12 h **B)** 16 h **C)** 24 h.

3.2.2 Expression de gènes clés dans la voie de signalisation de la formation de biofilm

Ensuite, nous avons voulu vérifier l'expression relative des gènes *sinI* et *sinR* qui sont impliqués dans la voie de signalisation menant à la formation de la matrice extracellulaire. En effet, il a été démontré que ces gènes peuvent être modulés au niveau de leur ARNm, ce qui a pour effet de réguler la formation de biofilm. Ainsi, il sera possible de voir si une souche surproduisant Hfq influence la stabilité de l'ARNm des gènes *sinI* et *sinR*.

Tel que montré dans la figure 12, il n'y a pas de différence significative dans les niveaux d'ARNm des deux gènes examinés en présence et en absence de la surproduction de la protéine Hfq. Ceci est valable pour tous les milieux de culture et les temps examinés. Ainsi, l'expression relative des gènes *sinI* et *sinR* n'est pas affectée lorsque la protéine Hfq est surproduite (Figure 12).

3.3 Vérification de l'effet de la chaperonne d'ARN Hfq sur l'ARNm de la surfactine

Il a été démontré que chez *B. subtilis*, Hfq co-précipite avec le 5' UTR de *srfAA*, un gène encodant pour la machinerie de synthèse de la surfactine. Afin d'évaluer plus précisément l'influence de la surproduction de la protéine Hfq, nous allons mesurer la quantité d'ARNm de la sous-unité A de la surfactine synthétase (*srfAA*) lors de la formation du biofilm par RT-qPCR.

La présence d'un 5' UTR en amont du gène *srfAA* est suggérée par des analyses transcriptomiques, mais n'a pas été établie avec certitude dans la littérature (Nicolas *et al.*, 2012). Dans le cadre de mon étude, il est donc pertinent de connaître précisément la longueur du 5' UTR de ce gène.

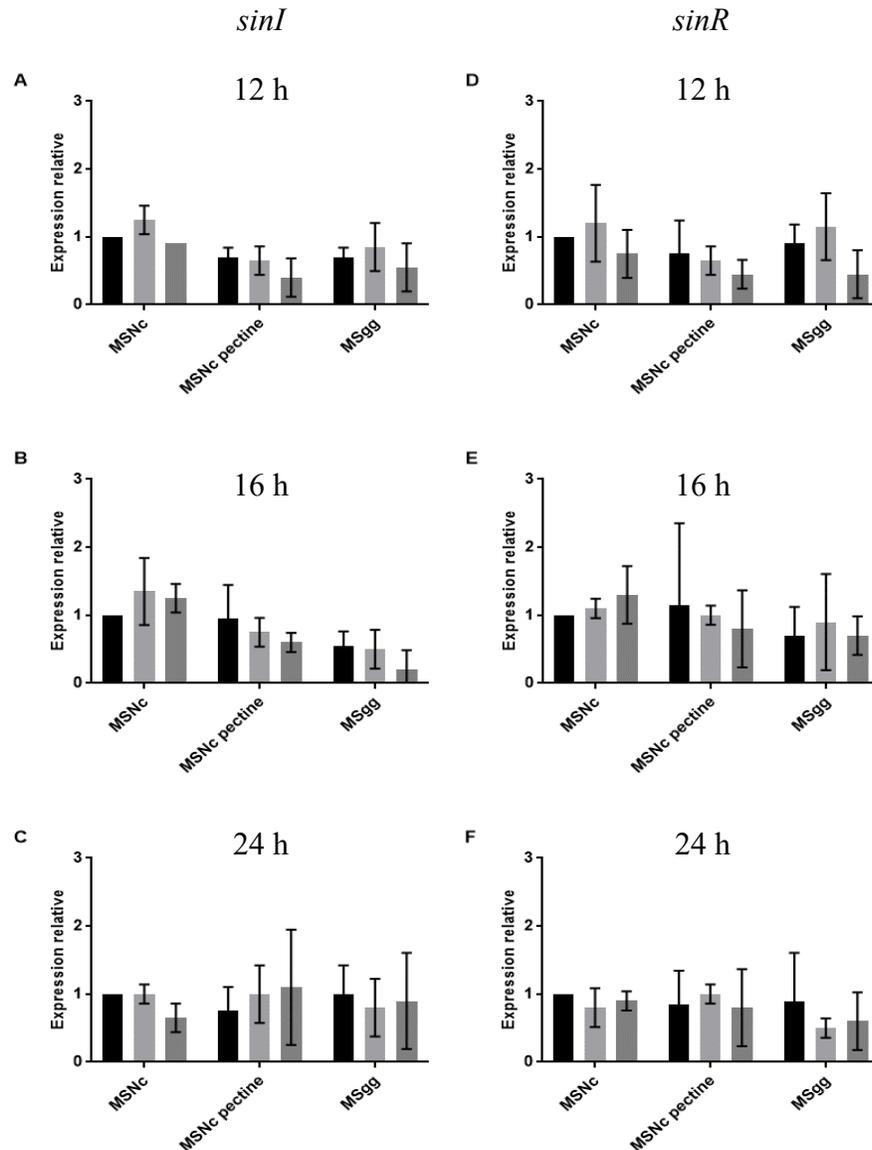


Figure 12. Expression relative de gènes clés dans la voie de signalisation menant à la formation de biofilm. RT-qPCR des gènes *sinI* et *sinR* pour les souches contrôle (WT, noir) et surproduction de la protéine Hfq non induite (gris pâle) ou induite (gris foncé) avec 500 μM d’IPTG (LT2) dans le temps lors de la formation de biofilm. Expression relative normalisée sur le gène *defA*. La comparaison des données est réalisée en utilisant l’analyse de la variance. Les résultats sont tous non significatifs ($P \geq 0,05$). **A, B, C)** expression relative du gène *sinI* à 12 h, 16 h et 24 h. **D, E, F)** expression relative du gène *sinR* à 12 h, 16 h et 24 h.

3.3.1 Cartographie de la région du 5' UTR du gène de la sous-unité A de la surfactine synthétase (*srfAA*)

Afin de caractériser le 5' UTR du gène *srfAA*, j'ai d'abord utilisé une approche par extension d'amorce. Cette expérience consiste à utiliser une sonde d'ADN complémentaire, radiomarquée à l'extrémité 5', à un ARNm spécifique dans l'échantillon total d'ARN. Par la suite, la sonde d'ADN est soumise à une transcription inverse jusqu'à l'extrémité 5' de l'ARNm. Ainsi, nous obtenons le site d'initiation de la transcription soit le nucléotide +1. Cependant, j'ai rencontré plusieurs problèmes techniques qui m'ont obligé à arrêter par manque de temps et de ressources. Donc, je n'ai pas pu trouver le +1 de transcription avec cette méthode.

Nous nous sommes alors tournés vers un dérivé de l'extension d'amorce pour cartographier la région du 5' UTR de ce gène. Cette technique consiste à employer différentes amorces réparties sur la région à tester. L'amorce anti-sens utilisé s'hybride à 637 pb en aval du gène *srfAA* tandis que les amorces sens sont toutes différentes. Ces amorces sont réparties à intervalles réguliers d'environ 100 pb pour couvrir une région de 985 pb qui englobe le début du gène *srfAA* ainsi que son 5' UTR. Toutes les amorces sens sont couplées avec l'amorce anti-sens pour effectuer un PCR utilisant de l'ADNc comme matrice. Les amorces sens donnant lieu à une amplification sont donc complémentaires à une région faisant partie du 5' UTR, et donc transcrite en ARN. Cependant, cette technique nous permet seulement de définir une zone où se situe le +1 de transcription et non un nucléotide précis.

Nous pouvons constater que quatre bandes sont amplifiées, et donc visibles sur gel, sur les sept couples d'amorces testés. L'amorce formant un fragment de 820 pb dans la région prédite du 5' UTR ne permet pas d'amplifier un fragment, ce qui suggère que cette région n'est probablement pas transcrite en ARN (Figure 13). Alors, nous pouvons conclure que le +1 de transcription se situerait soit entre 51 et 183 pb en amont du gène *srfAA* au lieu de 301 pb prédit.

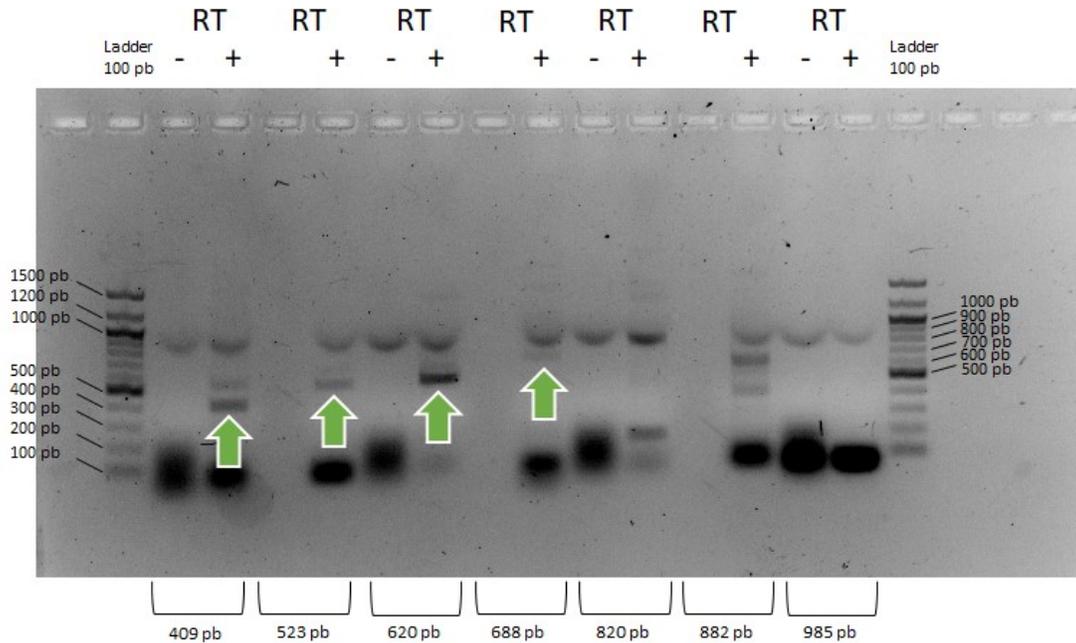


Figure 13. Cartographie du 5' UTR du gène de la sous-unité A de la surfactine synthétase (*srfAA*). Migration sur gel d'agarose 1,5 % des produits PCR. RT ; reverse transcriptase (- RT) PCR réalisé avec de l'ARN, (+ RT) PCR réalisé avec de l'ADNc. Les nombres représentés en paire de base (pb) sous le gel définissent la longueur des fragments PCR à partir de l'amorce anti-sens commune. Les flèches vertes représentent les bandes obtenues pour chaque PCR.

Afin d'augmenter la résolution de la zone où se trouve le nucléotide +1, nous avons refait l'expérience de cartographie du 5' UTR du gène *srfAA* avec des amorces qui se retrouvent entre la région de 688 pb et 820 pb définie ci-dessus.

Ces nouvelles amorces vont produire des fragments couvrants en totalité la région entre 688 pb et 820 pb définie par la première expérience de cartographie. La longueur des fragments de PCR de la figure 14 représente donc le fragment qui a été produit à l'intérieur de la région déjà établie lors de la première expérience de cartographie montrée ci-dessus.

Lors de cette deuxième expérience de cartographie, nous avons obtenu des bandes pour chaque fragment défini. Ce résultat suggère que l'entièreté de la région entre 688 et 820 pb est transcrite en ARN, et donc que le +1 de transcription n'est pas dans la région entre 688 pb et 820 pb (Figure 14), contredisant les résultats de la figure 13.

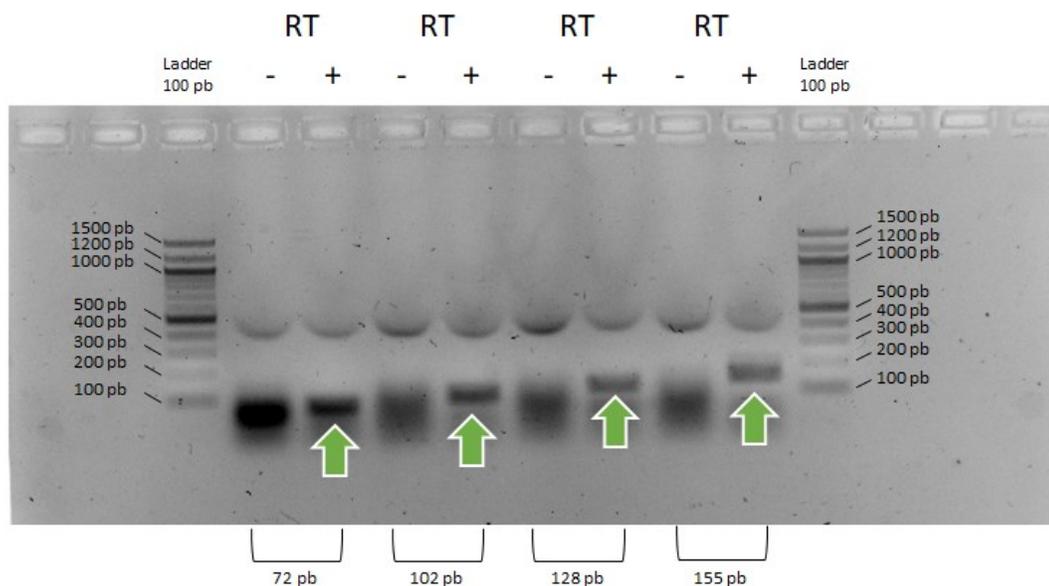


Figure 14. Cartographie précisée du 5' UTR du gène de la sous-unité A de la surfactine synthétase (*srfAA*). Obtention d'une meilleure définition de la région du +1 de transcription. Migration sur gel d'agarose 1,5 % des produits PCR. RT ; reverse transcriptase (- RT) PCR réalisé avec de l'ARN, (+ RT) PCR réalisé avec de l'ADNc. Les nombres représentés en paire de base (pb) sous le gel définissent la longueur des fragments PCR à partir de l'amorce anti-sens commune. Les flèches vertes représentent les bandes obtenues pour chaque PCR.

Ces résultats en apparence contradictoires pourraient résulter du fait que le gel présenté en figure 13 n'est pas assez précis pour nous permettre de voir avec certitude si la bande du fragment de 820 pb est bien présente. La bande pourrait être cachée puisqu'il y a une contamination dans la solution de chargement à environ 800 pb. Alors, la région comprenant le début du 5' UTR risque

donc de se situer entre 820 et 882 pb, ce qui implique que le 5' UTR serait d'une longueur située entre 183 et 245 pb comparé à 301 pb prédit. De ces résultats, nous pouvons cependant conclure qu'il y a présence d'un long 5' UTR, faisant entre 183 et 245 bp, en amont du gène *srfAA*.

3.3.2 Expression du gène de la sous-unité A de la surfactine synthétase (*srfAA*)

Nous avons également évalué la stabilité de l'ARNm de la sous-unité A de la surfactine synthétase (*srfAA*) par RT-qPCR, en présence et en absence de la surproduction de la protéine Hfq. Nous avons spécifiquement ciblé deux régions de l'ARNm, soit dans le 5' UTR puisqu'il a été démontré par co-immunoprécipitation qu'Hfq viendrait lier *srfAA* par son 5' UTR (Dambach *et al.*, 2013) et à la fin du gène.

La figure 15 indique qu'il n'y a aucune différence significative dans la quantité relative d'ARNm de *srfAA* entre les diverses souches, et ce dans les divers milieux de culture et temps examinés. Alors, l'expression relative du gène *srfAA* dans la région du 5' UTR ou à la fin du gène n'est pas affectée lorsque nous surproduisons la protéine Hfq (Figure 15).

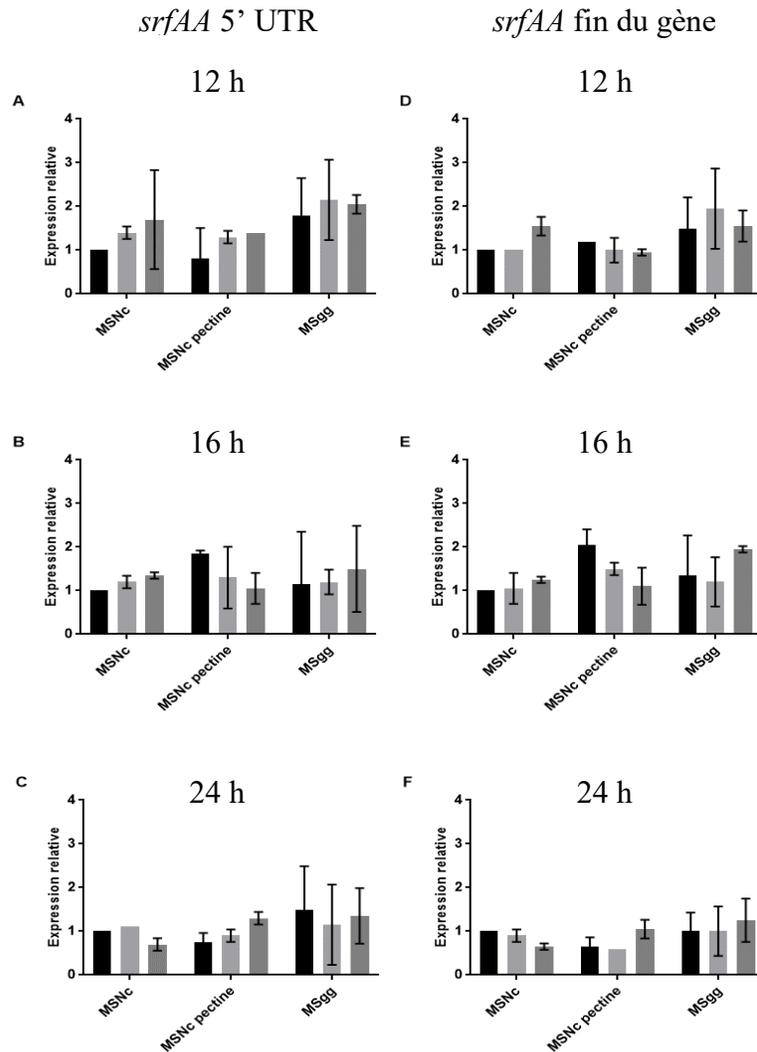


Figure 15. Expression relative du gène de la sous-unité A de la surfactine synthétase (*srfAA*). RT-qPCR du gène de la sous-unité A de la surfactine synthétase (*srfAA*) pour les souches contrôle (WT, noir) et surproduction de la protéine Hfq non induite (gris pâle) ou induite (gris foncé) avec 500 μ M d’IPTG (LT2) dans le temps lors de la formation de biofilm. Expression relative normalisée sur le gène *defA*. La comparaison des données est réalisée en utilisant l’analyse de la variance. Les résultats sont tous non significatifs ($P \geq 0,05$). **A, B, C)** expression relative du gène *srfAA* pour les amorces présentent dans le 5’ UTR du gène à 12 h, 16 h et 24 h. **D, E, F)** expression relative du gène *srfAA* pour les amorces présentent à la fin du gène à 12 h, 16 h et 24 h.

CHAPITRE 4

DISCUSSION GÉNÉRALE

4.1 Caractérisation de l'effet de la chaperonne d'ARN Hfq sur la formation de biofilm et la colonisation des racines de plante

La caractérisation de l'effet d'Hfq sur le biofilm a commencé avant mon arrivée au laboratoire par des essais préliminaires sur milieu gélosé pour former un biofilm. Ces essais sur milieu gélosé en laboratoire sont utilisés dans la littérature comme étant représentatifs de la formation de biofilm dans l'environnement. Tout d'abord, il avait été observé que le biofilm change d'aspect lors de la surproduction de la protéine Hfq tandis que sa délétion n'affecte en rien le biofilm. La croissance de la souche surproduisant Hfq a été comparée à la souche contrôle. Ces courbes de croissance n'ont pas présenté dans ce mémoire, mais la surproduction de la protéine Hfq ne présente aucun retard de croissance significatif. La croissance de la souche délétée pour Hfq n'a toutefois pas été analysée. Lors de mes essais de formation de biofilm sur milieu gélosé (Figure 5), j'ai confirmé que la délétion d'*hfq* n'affecte en rien le phénotype des colonies, et que la surproduction de la protéine Hfq change l'aspect phénotypique des colonies sur l'ensemble des milieux de culture. Ce changement de phénotype pourrait indiquer qu'Hfq interagirait dans la voie de signalisation de la formation de biofilm.

Hfq pourrait aider à stabiliser l'ARNm de certains gènes comme c'est le cas chez les bactéries à Gram négatif. Par exemple, il existe un petit ARN régulateur nommé RyhB chez *E. coli* qui va interagir avec Hfq et la RNase E pour induire la dégradation de l'ARNm *sodB* via l'inhibition de la traduction (Aiba, 2007). Donc, la protéine Hfq pourrait aider à la stabilité de certains ARNm impliqués dans la voie de signalisation menant à la formation de biofilm.

Pour vérifier cette hypothèse, des analyses de cytométrie en flux ont été réalisées pour observer l'activation du promoteur *tapA* fusionné au gène encodant pour la protéine fluorescente Yfp (reporteur $P_{tapA-yfp}$). L'activation du promoteur *tapA* permet l'expression de l'opéron *tapA-sipW-tasA* qui encode pour des protéines structurales nécessaires à la formation de la matrice du biofilm (Vlamakis *et al.*, 2013 ; Mielich-Süss et Lopez, 2015 ; Cairns *et al.*, 2014).

Tout d'abord, nous avons déterminé le meilleur moment auquel récolter les biofilms pour définir plus facilement l'effet de la surproduction de la protéine Hfq en cytométrie en flux. Les analyses ont finalement été réalisées avec des biofilms qui avaient 16 h de croissance, puisqu'il est plus facile d'observer une différence dans le pourcentage de cellules fluorescentes. Nous avons observé en cytométrie en flux que la surproduction de la protéine Hfq résulte en un plus grand pourcentage de cellules produisant de la matrice extracellulaire (Figure 6B). Cet effet est présent pour chacun des milieux examinés. Alors, il se pourrait qu'Hfq puisse influencer post-transcriptionnellement certains ARNm qui seraient impliqués dans la voie de signalisation de biofilm de façon positive.

Par la suite, l'intensité de fluorescence des cellules surproduisant Hfq a été mesurée (Figure 6C). Le résultat de cytométrie en flux décrit ci-dessus indique qu'un plus grand nombre de cellules produisent de la matrice cellulaire. Cependant, en milieu MSNc pectine l'intensité de fluorescence est moindre lors de la surproduction de la protéine Hfq. Donc, un plus grand nombre de cellules ont activé la transcription de l'opéron *tapA*, mais dans celles-ci l'activation est moindre comparée à la souche contrôle. Les polysaccharides de plantes, comme la pectine, sont connus pour faire partie des signaux environnementaux permettant l'activation de la formation de biofilm. Les travaux de Beauregard *et al.* (2013) suggère que les polysaccharides végétaux agissent à travers la voie d'induction du signal Spo0A/SinI (Beauregard *et al.*, 2013 ; Habib *et al.*, 2017). Bien que la voie par laquelle la pectine induit la formation de biofilm n'est pas bien connue pour le moment, elle serait différente de la voie impliquée en MSgg. Puisqu'en MSgg, seul le nombre de cellules produisant la matrice est affecté par la surproduction de la protéine Hfq alors que le nombre de cellules et le taux de production sont affectés en présence

de pectine, ceci suggère qu'Hfq agirait sur une partie de la voie d'induction différente entre les deux milieux.

Étant donné que la délétion d'*hfq* n'a aucun effet sur la formation de biofilm (Figure 6A), il se pourrait qu'il y ait un effet semblable par une protéine redondante. En effet, il existe certains organismes qui encodent pour plus d'une protéine Hfq, tel que *Bacillus anthracis* qui en possède trois (Panda *et al.*, 2015). Dans le cadre de mes recherches, la redondance fonctionnelle est également testée à l'aide d'un essai de cytométrie en flux. Cette expérience est réalisée en surproduisant trois petites protéines (YlmH, YqeI et YtpR) non caractérisées qui possèdent un domaine prédit de liaison à l'ARN comme c'est le cas pour Hfq. Ce contrôle de la surproduction nous permet de vérifier si l'effet d'Hfq n'est pas seulement dû à la surproduction d'une protéine.

Nous pouvons constater que le nombre de cellules exprimant le reporteur de la matrice extracellulaire ($P_{tapA-yfp}$) est semblable entre la surproduction des protéines non induite et induite pour les trois protéines (Figure 7). De grandes barres d'erreur sont visibles sur chacun des graphiques puisque les deux expériences réalisées étaient assez différentes entre elles. Cependant, pour chacun des réplicats biologique l'absence d'effet était clair. Ces résultats ne démontrent qu'aucune de ces trois protéines ne permet une augmentation semblable à celle observée lorsqu'Hfq est surproduit. Donc, l'effet observé lors de la surproduction de la protéine Hfq est réellement dû à sa surproduction et non au simple fait de surproduire une protéine quelconque. Il est également possible d'affirmer que ces protéines ne sont pas redondantes puisque leur surproduction n'a pas eu d'effet sur l'expression du reporteur de la matrice comparé à la surproduction de la protéine Hfq. Toutefois, nous ne pouvons pas négliger une redondance par une autre protéine non testé dans mes expériences puisque d'autres protéines encore inconnues pourraient avoir de tels rôles.

La caractérisation de l'effet d'Hfq sur la colonisation a commencé avec des essais préliminaires de microscopie à fluorescence. Avant mon arrivée au laboratoire, il avait été démontré que la

surproduction de la protéine Hfq augmentait la colonisation des racines de plantes. Cette expérience est réalisée grâce à une observation par microscopie à fluorescence des racines d'*Arabidopsis thaliana* colonisées par *Bacillus subtilis* qui exprime le reporteur de la matrice extracellulaire (P_{tapA} -yfp). Donc, les cellules fluorescentes observables sur les racines de plantes vont également exprimer les gènes responsables de la formation de matrice extracellulaire.

J'ai refait cette même expérience, et une analyse qualitative m'a mené à confirmer que les racines d'*A. thaliana* sont plus colonisées par une souche de *B. subtilis* qui surproduit Hfq et cette colonisation est plus importante et uniforme sur toute la racine (Figure 8). Ensuite, nous avons voulu confirmer nos observations qualitatives par microscopie avec un essai qui permet des observations plus quantitatives de la colonisation. Cet essai permet de quantifier le nombre de pixels fluorescents sur une photo de racine complète par rapport à sa longueur. L'expérience a démontré que le niveau de colonisation de la racine entière ne change pas significativement lors de la surproduction de la protéine Hfq, contredisant les résultats obtenus auparavant (Figure 9). Ce résultat indique que des essais qualitatifs, comme ceux présentés à la figure 8, sont biaisés lorsque vient le moment de tirer une conclusion définitive. Cependant, l'analyse quantitative considère l'ensemble de la racine et ne permet pas d'évaluer si la colonisation est uniforme ou hétérogène. En effet, des observations à l'œil nu suggèrent que la colonisation par la souche surproduisant la protéine Hfq est plus uniforme comparée au contrôle; pour la surproduction, les régions colonisées seraient plus étendues. Ainsi, l'utilisation des deux approches est possiblement la plus appropriée pour établir un phénotype dans ce type d'expérience.

Dans la littérature, il a déjà été prouvé que la délétion d'*hfq* chez *B. subtilis* diminue l'expression des gènes impliqués dans la chimiotaxie (Jagtap *et al.*, 2016). Donc, la surproduction de la protéine Hfq pourrait amplifier l'expression de certains gènes impliqués dans la chimiotaxie. Alors, il serait possible qu'il y ait des zones plus colonisées sur la racine lors de la surproduction de la protéine Hfq puisque ces cellules seraient plus attirées par certaines zones de la racine. Pour vérifier cette hypothèse, une expérience semblable à celle utilisée à la figure 9 pourrait être réalisée sur les régions qui nous semblent plus colonisées. De plus, une expérience de

chimiotaxie en utilisant une souche délétée et surproduisant Hfq vers des exsudats racinaires serait également intéressante puisqu'il est connu que *B. subtilis* est attiré par les racines de plantes via le mécanisme de chimiotaxie (Allard-Massicotte *et al.*, 2016). Cependant, ce résultat ne change pas le fait qu'au total la colonisation sur la racine entière ne varie pas.

4.2 Détermination de l'effet de la chaperonne d'ARN Hfq sur différents gènes impliqués lors de la formation de biofilm

Nous avons voulu tester si le niveau d'ARNm du gène *hfq* fluctue lorsque le biofilm se forme. Une fluctuation dans l'expression de ce gène pourrait indiquer l'implication de la protéine Hfq dans un stade bien précis lors de la formation de biofilm. Il est possible de constater que l'expression relative de la chaperonne d'ARN Hfq est significativement plus élevée dans le milieu de culture MSgg relativement aux autres milieux de culture 12 h après l'inoculation pour former un biofilm (Figure 10). Cependant, 16 h et 24 h après l'inoculation l'expression relative du gène *hfq* reste non significative.

Ces résultats démontrent que le niveau d'ARNm reste relativement constant lorsque le biofilm commence à se former. Cependant, l'efficacité de traduction de cet ARNm n'est pas analysée dans cette expérience. Toutefois, il a déjà été prouvé par western blot que la protéine Hfq est retrouvée en plus grande quantité à la fin de la phase exponentielle de croissance en milieu de culture liquide (Rochat *et al.*, 2015). Alors, il reste possible que la quantité de la protéine Hfq change lors de la formation de biofilm. Un changement dans la quantité de cette protéine pourrait avoir un effet sur la formation de biofilm en affectant des ARNm présents dans la voie de signalisation. Cependant, il ne semble pas y avoir d'effet visible selon les résultats phénotypiques des biofilms sur milieux gélosés avec une souche sauvage.

Certains ARNm de gènes encodant pour des protéines centrales à la formation de biofilms sont dégradés par des RNAses. Il a été démontré par Deloughery *et al.* (2016) qu'un complexe

protéique YlbF-YmcA-YaaT est capable d'influencer le niveau de l'ARNm de *sinR* par son interaction avec l'endoribonucléase RNase Y. L'ARNm de *sinR* a été caractérisé comme étant modulé pendant la formation de biofilm pour permettre la production de matrice extracellulaire. Alors, puisque SinR est une protéine qui réprime l'expression des gènes impliqués dans la formation de biofilm, la dégradation de son ARNm permet l'expression de la matrice.

L'expression relative des gènes codant pour les protéines SinI et SinR a été analysée puisque le niveau de ces protéines est crucial pour la formation de biofilm (Vlamakis *et al.*, 2013). Des essais réalisés avec la souche qui surproduit Hfq nous permettent de conclure qu'il n'y a aucune différence significative dans les niveaux relatifs de ces ARNm entre les différentes souches et milieux de culture dans le temps (Figure 12). Il est possible que les grandes barres d'erreurs soient attribuables à une certaine variabilité dans les milieux de culture utilisés, qui sont composés de plusieurs solutions. Un changement même minime dans la composition de ces milieux peut parfois affecter l'induction de la formation de biofilm, et donc l'expression de certains gènes. Comme nous ne voyons pas d'effet de la surproduction de la protéine Hfq sur les ARNm, il est possible que le rôle de cette protéine se situe plutôt au niveau de la traduction de ces ARNm. Pour ce faire, des études de protéomique pourront être réalisées pour évaluer si la surproduction de la protéine Hfq influence la quantité de protéine SinI et/ou de SinR produit lors de la formation de biofilm.

4.3 Vérification de l'effet de la chaperonne d'ARN Hfq sur l'ARNm de la surfactine

Une étude de Dambach *et al.* (2013) a démontré que la protéine Hfq pouvait co-immunoprécipiter avec l'ARNm de la sous-unité A de la surfactine synthétase (*srfAA*). La liaison se ferait vraisemblablement dans la région du 5' UTR de *srfAA*. Des études de transcriptomique suggèrent que l'ARNm de la sous-unité A de la surfactine synthétase posséderait un 5' UTR long de 301 pb, ce qui n'a pas été confirmé (Nicolas *et al.*, 2012). La

surfactine est également impliquée dans l'induction de la voie de signalisation de la formation de biofilm (López *et al.*, 2010).

Des études ont été réalisées pour cartographier la région où se trouve le 5' UTR du gène *srfAA*. Des RT-PCR utilisant des amorces s'hybridant à différentes régions autour du gène *srfAA* ont permis de révéler une région potentielle où se situerait le +1 de transcription d'environ 100 pb. Cette zone se situe entre la région de 51 pb et 183 pb avant en amont du gène *srfAA* au lieu de 301 pb prédit (Figure 13). Un deuxième essai a été effectué pour réduire la zone possible de 100 pb à environ 50 pb. Cependant, nous avons obtenu des bandes pour chaque couple d'amorces, suggérant que le +1 de transcription n'est pas présent dans la région entre 688 pb et 820 pb (Figure 14).

Cette contradiction entre les deux expériences pourrait s'expliquer par le fait que le premier gel n'aurait pas bien fonctionné et que certaines bandes ne seraient pas visibles. Le +1 de transcription pourrait donc se retrouver entre les fragments de 820 pb et 882 pb. Dans ce cas, une bande qui aurait dû être visible à environ 800 pb dans la première figure pourrait être cachée par les bandes recourbées visibles sur le gel qui proviennent de la solution de chargement. Il est aussi possible que la reverse transcriptase (RT) utilisée dans le cadre de cette expérience, ne soit pas en mesure de compléter en totalité le fragment. Nos résultats suggèrent donc que le +1 de transcription se situerait entre 183 et 245 pb en amont du gène *srfAA*, plutôt que à 301 pb comme le prédisent les analyses transcriptomiques (Nicolas *et al.*, 2012). La caractérisation du 5' UTR est très importante puisqu'il comprend la région où va se déposer les ribosomes (RBS) pour induire la traduction. Alors, une méthode comme le 5' RACE pourrait être utilisé au lieu de l'extension d'amorce pour déterminer l'emplacement du 5' UTR. De plus, certaines protéines comme Hfq chez les Gram négatif peuvent venir s'y lier pour permettre une régulation de la traduction ou une stabilisation de l'ARNm (De Lay *et al.*, 2013 ; Lalaouna *et al.*, 2013).

Ensuite, l'expression relative du gène *srfAA* a été analysée par RT-qPCR plus précisément dans la partie du 5' UTR et de la fin du gène étant donné qu'il est impliqué directement dans l'induction de l'expression de la matrice extracellulaire. Les essais réalisés démontrent que l'expression relative du gène *srfAA* dans la région du 5' UTR ou à la fin du gène n'est pas affectée lorsque la protéine Hfq est surproduite (Figure 15). L'absence d'effet sur cet ARNm suggère qu'il est possible que le rôle d'Hfq se situe plutôt au niveau de la traduction de son ARNm. Pour ce faire, des essais de protéomique servant à évaluer la quantité du complexe protéique SrfAA-AD ou des essais visant à évaluer directement la quantité de surfactine pourront être réalisés.

CHAPITRE 5

CONCLUSION

Dans la société moderne, il est très important de mieux connaître le mécanisme menant à la formation de biofilm, puisque ceux-ci peuvent être tant problématiques que bénéfiques. Chez le microorganisme modèle *Bacillus subtilis*, utilisé dans cette étude, la formation de biofilm est bénéfique. En effet, le biofilm de *B. subtilis* favorise la croissance de la plante et protège celle-ci contre des infections par des bactéries pathogènes. Cette bactérie est utilisée comme un biofertilisant et agent de contrôle biologique en agriculture (Chen *et al.*, 2013).

En somme, il est très pertinent d'avoir une meilleure compréhension du fonctionnement moléculaire de *B. subtilis* lors de la formation de son biofilm. L'utilisation de cette bactérie comme biofertilisant en sera facilitée puisque nous allons mieux comprendre le mécanisme de formation du biofilm, requis pour la colonisation des plantes. Il sera également intéressant de voir l'implication de la protéine Hfq chez les Gram positif puisque les fonctions de cette protéine chez ces organismes ne sont pas très comprises en ce moment.

Mes études ont permis de démontrer trois principales conclusions. Tout d'abord, la surproduction de la protéine Hfq permet une augmentation de la formation de biofilm et un changement de phénotype alors que la délétion n'affecte rien. Ensuite, la colonisation des racines d'*Arabidopsis thaliana* par *B. subtilis* n'est pas globalement affectée par la surproduction ou la délétion de la protéine Hfq. Enfin, des analyses de RT-qPCR suggèrent que la surproduction de la protéine Hfq n'affecte pas l'expression de différents gènes clés au cours de la formation de biofilm. Tous ces résultats démontrent que la délétion de la protéine Hfq n'a pas d'impact dans les conditions examinées. Cependant, la surproduction de cette protéine provoque un changement phénotype des biofilms sur milieux gélosés, mais son implication dans la formation de biofilm n'est toutefois pas encore comprise. Dans l'avenir, il faudrait investiguer plus

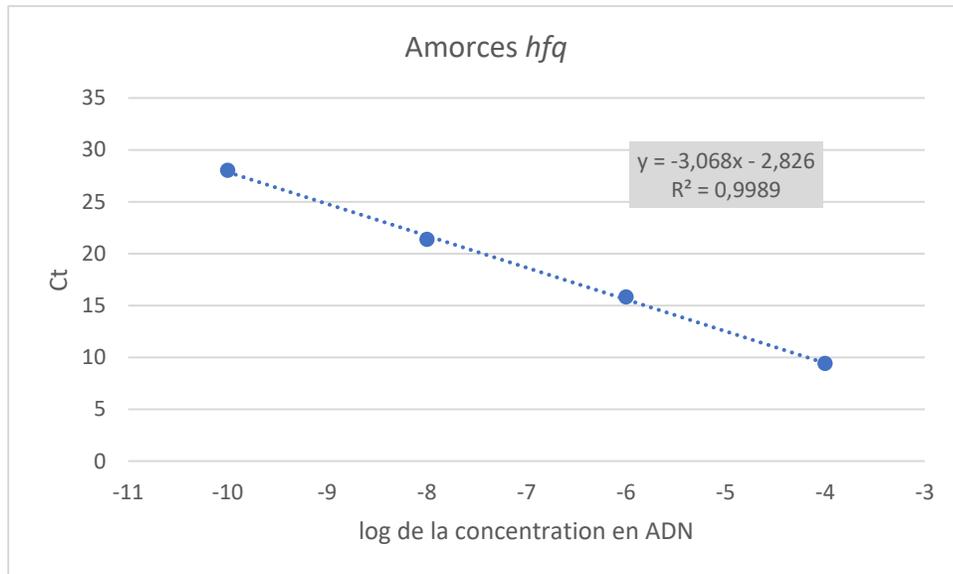
amplement l'effet qu'a la protéine Hfq lorsqu'elle est surproduite puisqu'elle affecte vraisemblablement la voie de signalisation menant à la formation de biofilm.

Mon hypothèse de recherche était que la protéine Hfq agirait sur la stabilité des ARNm de gènes qui influencent la formation de biofilm et la colonisation des racines de plantes. Cependant, il serait possible de penser qu'Hfq pourrait être impliquée dans la traduction de l'ARNm de certains gènes impliqués dans la formation de biofilm plutôt que dans leur stabilité. Pour ce faire, des essais de protéomique devraient être réalisés pour être en mesure de constater si la quantité de protéine change lorsque la protéine Hfq est surproduite ou délétée. Le protéome de *B. subtilis* pourrait ainsi être analysé en entier pour voir l'effet général de la surproduction de la protéine Hfq sur ces protéines. Un immunobuvardage Western détecterait la protéine Hfq exprimant une étiquette puisqu'il n'existe presque pas d'anticorps nécessaire à mon projet disponible chez *B. subtilis*.

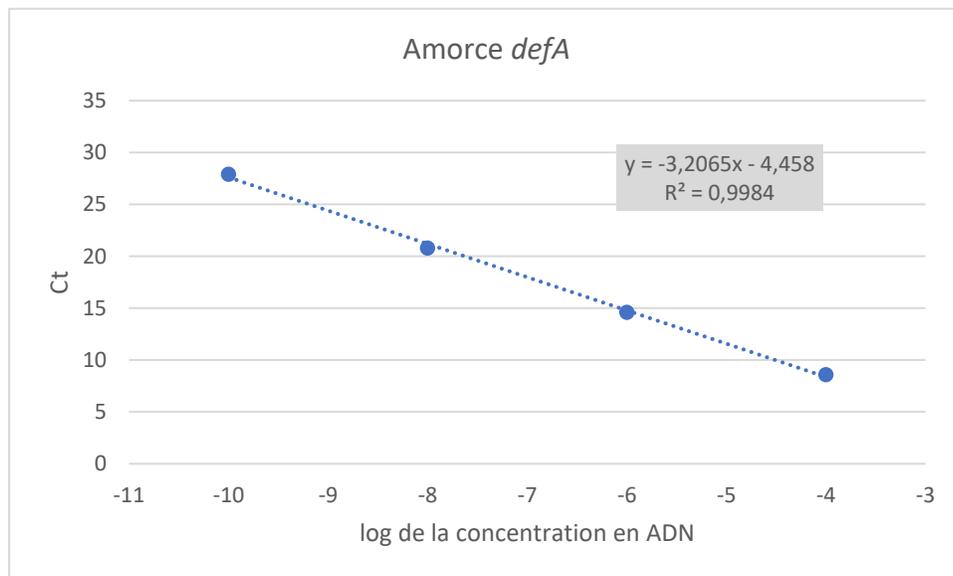
Il serait également pertinent de poursuivre la validation de la présence du 5' UTR de *srfAA* en confirmant la position du nucléotide +1 grâce à des essais d'extension d'amorce. Le 5' UTR d'un gène permet la liaison de certaines protéines comme Hfq en amont du RBS pour réguler la traduction de certains ARNm (De Lay *et al.*, 2013 ; Lalaouna *et al.*, 2013). Alors, il pourrait être intéressant de faire un lien entre la présence d'un 5' UTR chez *srfAA* et la régulation de sa traduction dans le cadre de la formation de biofilm.

ANNEXE 1

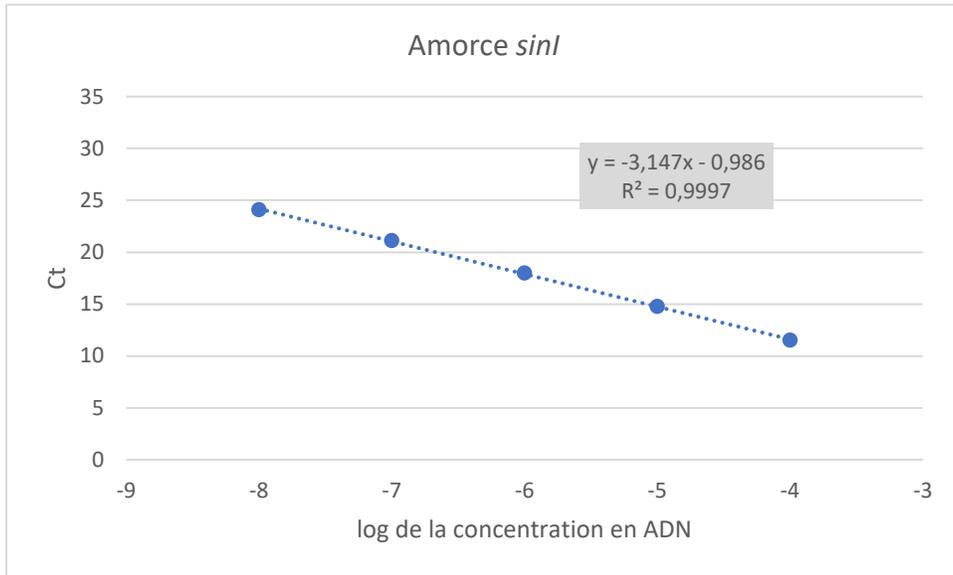
Courbe d'efficacité des amorces de qPCR



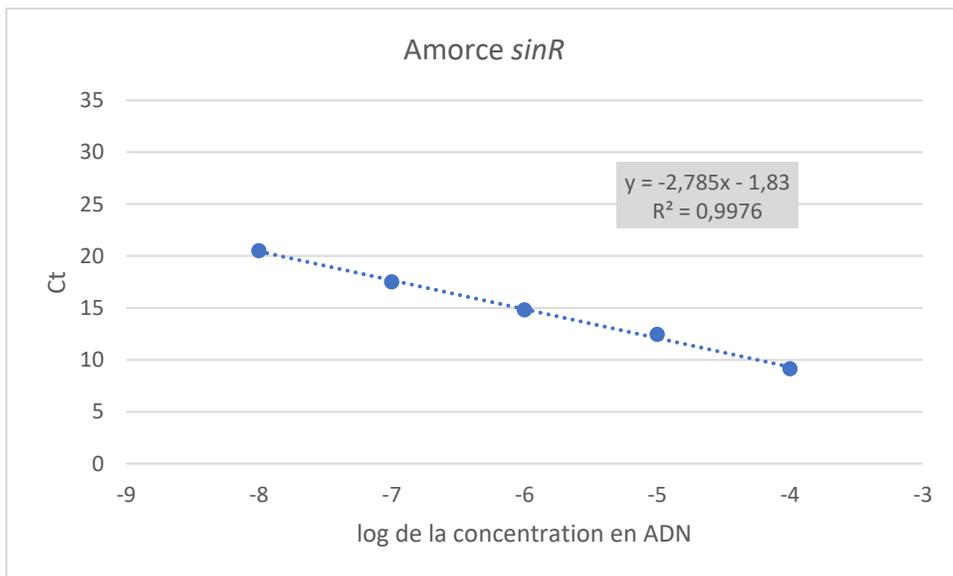
hfq : Le facteur d'amplification est de 2,12 et l'efficacité de 111,81 %



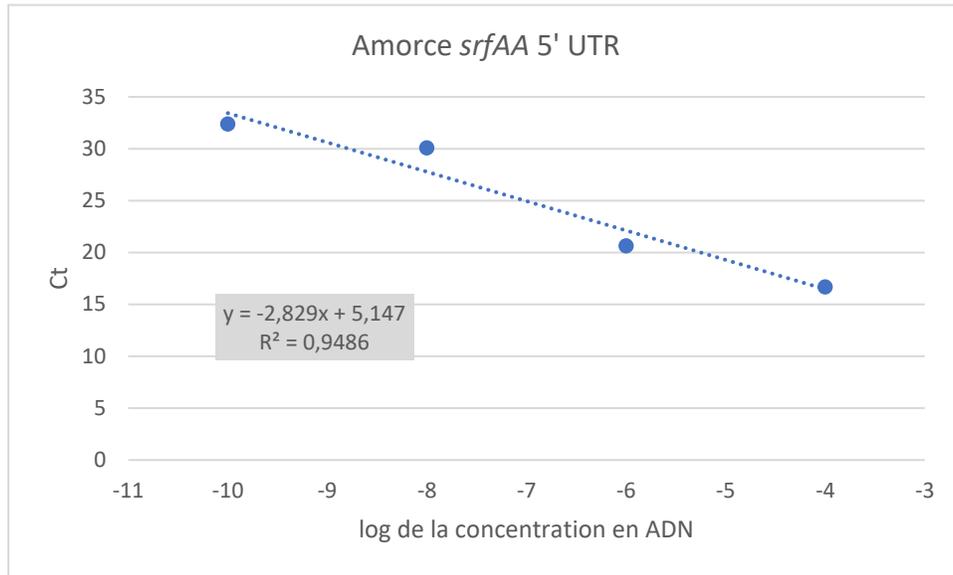
defA : Le facteur d'amplification est de 2,05 et l'efficacité de 105,05 %



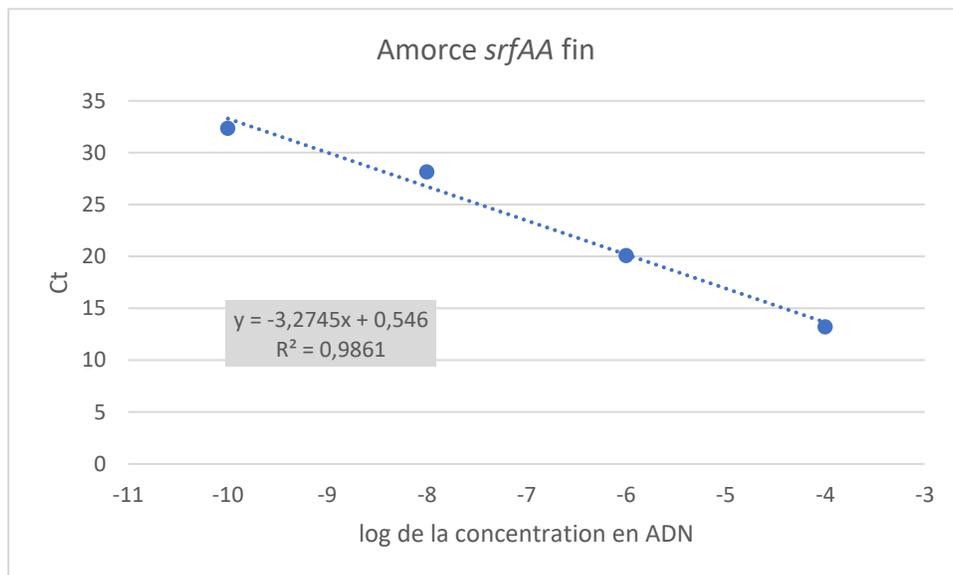
sinI : Le facteur d'amplification est de 2,08 et l'efficacité de 107,86 %



sinR : Le facteur d'amplification est de 2,29 et l'efficacité de 128,63 %



srfAA 5' UTR : Le facteur d'amplification est de 2,26 et l'efficacité de 125,67 %



srfAA fin : Le facteur d'amplification est de 2,02 et l'efficacité de 102,02 %

BIBLIOGRAPHIE

Aiba, H. (2007). Mechanism of RNA silencing by Hfq-binding small RNAs. *Current Opinion in Microbiology* *10*, 134-139.

Aleti, G., Lehner, S., Bacher, M., Compant, S., Nikolic, B., Plesko, M., Schuhmacher, R., Sessitsch, A., and Brader, G. (2016). Surfactin variants mediate species-specific biofilm formation and root colonization in *Bacillus*. *Env. Microbiol.* *18*, 2634-2645.

Allard-Massicotte, R., Tessier, L., Lécuyer, F., Lakshmanan, V., Lucier, J. F., Garneau, D., Caudwell, L., Vlamakis, H., Bais, H. P., and Beauregard, P. B. (2016). *Bacillus subtilis* early colonization of *Arabidopsis thaliana* roots involves multiple chemotaxis receptors. *MBio* *7*, 1-10.

Artale, B. (2014). Developing Genetic Tools for *Geobacillus*.

Baba, S., Someya, T., Kawai, G., Nakamura, K., and Kumasaka, T. (2010). Expression, crystallization and preliminary crystallographic analysis of RNA-binding protein Hfq (YmaH) from *Bacillus subtilis* in complex with an RNA aptamer. *Acta Crystallographica Section F: Structural Biology and Crystallization Communications* *66*, 563-566.

Beauregard, P. B., Chai, Y., Vlamakis, H., Losick, R., and Kolter, R. (2013). *Bacillus subtilis* biofilm induction by plant polysaccharides. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *110*, E1621-E1630.

Boudry, P., Gracia, C., Monot, M., Caillet, J., Saujet, L., Hajnsdorf, E., Dupuy, B., Martin-Verstraete, I., and Soutourina, O. (2014). Pleiotropic role of the RNA chaperone protein Hfq in the human pathogen *Clostridium difficile*. *Journal of Bacteriology* *196*, 3234-3248.

Boulloc, P., and Repoila, F. (2016). Fresh layers of RNA-mediated regulation in Gram-positive bacteria. *Curr. Opin. Microbiol.* *30*, 30-35.

Cairns, L. S., Hogley, L., and Stanley-Wall, N. R. (2014). Biofilm formation by *Bacillus subtilis*: new insights into regulatory strategies and assembly mechanisms. *Mol. Microbiol.* *93*, 587-598.

Chao, Y., and Vogel, J. (2010). The role of Hfq in bacterial pathogens. *Current Opinion in Microbiology* *13*, 24-33.

Comella, N., and Grossman, A. D. (2005). Conservation of genes and processes controlled by the quorum response in bacteria: Characterization of genes controlled by the quorum-sensing transcription factor ComA in *Bacillus subtilis*. *Molecular Microbiology* *57*, 1159-1174.

- Cutting, S., Oke, V., Driks, A., Losick, R., Lu, S., and Kroos, L. (1990). A forespore checkpoint for mother cell gene expression during development in *Bacillus subtilis*. *Cell* 62, 239-250.
- Chen, Y., Yan, F., Chai, Y., Liu, H., Kolter, R., Losick, R., and Guo, J. H. (2013). Biocontrol of tomato wilt disease by *Bacillus subtilis* isolates from natural environments depends on conserved genes mediating biofilm formation. *Env. Microbiol.* 15, 848-864.
- Costerton, J. W., Cheng, K. J., Geesey, G. G., Ladd, T. I., Nickel, J. C., Dasgupta, M., and Marrie, T. J. (1987). Bacterial biofilms in nature and disease. *Ann. Rev. Microbiol.* 41, 435-464.
- Dambach, M., Irnov, I., and Winkler, W. C. (2013). Association of RNAs with *Bacillus subtilis* Hfq. *PLoS One* 8, e55156.
- Debois, D., Fernandez, O., Franzil, L., Jourdan, E., de Brogniez, A., Willems, L., Clément, C., Dorey, S., De Pauw, E., and Ongena, M. (2015). Plant polysaccharides initiate underground crosstalk with bacilli by inducing synthesis of the immunogenic lipopeptide surfactin. *Environmental Microbiology Reports* 7, 570-582.
- De Lay, N., Schu, D. J. and Gottesman, S. (2013). Bacterial Small RNA-based Negative Regulation: Hfq and Its Accomplices. *J. Biol. Chem.* 288, 7996-8003.
- Deloughery, A., Dengler, V., Chai, Y., and Losick, R. (2016). Biofilm formation by *Bacillus subtilis* requires an endoribonuclease-containing multisubunit complex that controls mRNA levels for the matrix gene repressor SinR. *Mol. Microbiol.* 99, 425-437.
- DiChiara, J. M., Liu, B., Figaro, S., Condon, C., and Bechhofer, D. H. (2016). Mapping of internal monophosphate 5' ends of *Bacillus subtilis* messenger RNAs and ribosomal RNAs in wild-type and ribonuclease-mutant strains. *Nucleic Acids Res.* 82, gkw073.
- Franze de Fernandez, M. T., Eoyang, L., and August, J. T. (1968). Factor fraction required for the synthesis of bacteriophage Q β -RNA. *Nature* 219, 862-863.
- Fröhlich, K. S., and Vogel, J. (2009). Activation of gene expression by small RNA. *Current Opinion in Microbiology* 12, 674-682.
- Guérout-Fleury, A. M., Frandsen, N., and Stragier, P. (1996). Plasmids for ectopic integration in *Bacillus subtilis*. *Gene* 180, 57-61.

Habib, C., Yu, Y., Gozzi, K., Ching, C., Shemesh, M., and Chai, Y. (2017). Characterization of the regulation of a plant polysaccharide utilization operon and its role in biofilm formation in *Bacillus subtilis*. *PLoS One* 12, 1-24.

Hall-Stoodley, L., Costerton, J. W., and Stoodley, P. (2004). Bacterial biofilms: From the natural environment to infectious diseases. *Nat. Rev. Microbiol.* 2, 95-108.

Hämmerle, H., Amman, F., Večerek, B., Stülke, J., Hofacker, I., and Bläsi, U. (2014). Impact of Hfq on the *Bacillus subtilis* transcriptome. *PLoS One* 9, e98661.

Härtl, B., Wehrl, W., Wiegert, T., Homuth, G., and Schumann, W. (2001). Development of a New Integration Site within the *Bacillus subtilis* Chromosome and Construction of Compatible Expression Cassettes. *Society* 183, 2696-2699.

Jagtap, C. B., Kumar, P., and Rao, K. K. (2016). *Bacillus subtilis* Hfq: A role in chemotaxis and motility. *J. Biosci.* 41, 347-358.

Lalaouna, D., Simoneau-Roy, M., Lafontaine, D., and Massé, E. (2013). Regulatory RNAs and target mRNA decay in prokaryotes. *Biochimica et Biophysica Acta - Gene Regulatory Mechanisms* 1829, 742-747.

Li, X., Yang, H., Zhang, D., Li, X., Yu, H., and Shen, Z. (2015). Overexpression of specific proton motive force-dependent transporters facilitate the export of surfactin in *Bacillus subtilis*. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 42, 93-103.

López, D., Fischbach, M. A., Chu, F., Losick, R., and Kolter, R. (2009a). Structurally diverse natural products that cause potassium leakage trigger multicellularity in *Bacillus subtilis*. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 106, 280-285.

López, D., Vlamakis, H., and Kolter, R. (2010). Biofilms. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 2, 1-11.

López, D., Vlamakis, H., Losick, R., and Kolter, R. (2009b). Paracrine signaling in a bacterium. *Genes Dev.* 23, 1631-1638.

Marvasi, M., Visscher, P. T., and Casillas Martinez, L. (2010). Exopolymeric substances (EPS) from *Bacillus subtilis*: Polymers and genes encoding their synthesis. *FEMS Microbiology Letters* 313, 1-9.

Massé, E., Majdalani, N., and Gottesman, S. (2003). Regulatory roles for small RNAs in bacteria. *Current Opinion in Microbiology* 6, 120-124.

- Mielich-Süss, B., and Lopez, D. (2015). Molecular mechanisms involved in *Bacillus subtilis* biofilm formation. *Environ. Microbiol.* *17*, 555-565.
- Murina, V. N., and Nikulin, A. D. (2016). Bacterial Small Regulatory RNAs and Hfq Protein. *Biochemistry* *80*, 1647-1654.
- Nicolas, P., Mäder, U., Dervyn, E., Rochat, T., Leduc, A., Pigeonneau, N., Bidnenko, E., Marchadier, E., Hoebeke, M., Aymerich, S., *et al.* (2012). Condition-Dependent Transcriptome Reveals High-Level Regulatory Architecture in *Bacillus subtilis*. *Science* *335*, 1103-1106.
- O’Gara, J. P. (2007). *ica* and beyond: Biofilm mechanisms and regulation in *Staphylococcus epidermidis* and *Staphylococcus aureus*. *FEMS Microbiology Letters* *270*, 179-188.
- Panda, G., Tanwer, P., Ansari, S., Khare, D., and Bhatnagar, R. (2015). Regulation and RNA-binding properties of Hfq-like RNA chaperones in *Bacillus anthracis*. *Biochimica et Biophysica Acta* *1850*, 1661-1668.
- Pratt, L. A., and Kolter, R. (1998). Genetic analysis of *Escherichia coli* biofilm formation: Roles of flagella, motility, chemotaxis and type I pili. *Molecular Microbiology* *30*, 285-293.
- Rajkowitsch, L., Chen, D., Stampfl, S., Semrad, K., Waldsich, C., Mayer, O., Jantsch, M. F., Konrat, R., Bläsi, U., and Schroeder, R. (2007). RNA Chaperones, RNA Annealers and RNA Helicases. *RNA Biology* *4*, 118-130.
- Rochat, T., Delumeau, O., Figueroa-Bossi, N., Noiro, P., Bossi, L., Dervyn, E., and Bouloc, P. (2015). Tracking the Elusive Function of *Bacillus subtilis* Hfq. *PLoS One* *10*, e0124977.
- Ryder, C., Byrd, M., and Wozniak, D. J. (2007). Role of polysaccharides in *Pseudomonas aeruginosa* biofilm development. *Current Opinion of Microbiology* *10*, 644-648.
- Semrad, K. (2011). Proteins with RNA chaperone activity: A world of diverse proteins with a common task-impediment of RNA misfolding. *Biochem. Res. Int.* *2011*.
- Singh, R., Paul, D., and Jain, R. K. (2006). Biofilms: implications in bioremediation. *Trends in Microbiology* *14*, 389-397.
- Someya, T., Baba, S., Fujimoto, M., Kawai, G., Kumasaka, T., and Nakamura, K. (2012). Crystal structure of Hfq from *Bacillus subtilis* in complex with SELEX-derived RNA aptamer: insight into RNA-binding properties of bacterial Hfq. *Nucleic Acids Research* *40*, 1856-1867.

Updegrave, T. B., Shabalina, S. A., and Storz, G. (2015). How do base-pairing small RNAs evolve? *FEMS Microbiology Reviews* 39, 379-391.

Updegrave, T. B., Zhang, A., and Storz, G. (2016). Hfq: The flexible RNA matchmaker. *Current Opinion in Microbiology* 30, 133-138.

Vlamakis, H., Chai, Y., Beaugard, P., Losick, R., and Kolter, R. (2013). Sticking together: building a biofilm the *Bacillus subtilis* way. *Nat. Rev. Microbiol.* 11, 157-168.

Vogel, J., and Luisi, B. F. (2011). Hfq and its constellation of RNA. *Nat. Rev. Microbiol.* 9, 578-589.

Vollenbroich, D., Mehta, N., Zuber, P., Vater, J., and Kamp, R. M. (1994). Analysis of surfactin synthetase subunits in *srfA* mutants of *Bacillus subtilis* OKB105. *J. Bacteriol.* 176, 395-400.

Yasbin, R. E., and Young, F. E. (1974). Transduction in *Bacillus subtilis* by Bacteriophage SPP1. *Journal of Virology* 14, 1343-1348.

Zheng, A., Panja, S., and Woodson, S. A. (2016). Arginine Patch Predicts the RNA Annealing Activity of Hfq from Gram-Negative and Gram-Positive Bacteria. *J. Mol. Biol.* 428, 2259-2264.

Zhu, B., and Stülke, J. (2018). SubtiWiki in 2018: From genes and proteins to functional network annotation of the model organism *Bacillus subtilis*. *Nucleic Acids Research* 46, D743-D748.

