



L'IMPLICATION DE LA SURFACTINE DANS LA FORMATION DE BIOFILM EN  
ASSOCIATION AVEC LES RACINES DE PLANTES CHEZ *BACILLUS SUBTILIS*

Par

**MAUDE THÉRIEN**

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, janvier 2021

Le 5 janvier 2021

*Le jury a accepté le mémoire de Madame Maude Thérien dans sa version finale.*

MEMBRES DU JURY

Professeure Pascale B. Beaugard  
Directrice de recherche  
Département de biologie  
Université de Sherbrooke

Professeure Carole Beaulieu  
Évaluatrice interne  
Département de biologie  
Université de Sherbrooke

Professeur François Malouin  
Président-rapporteur  
Département de biologie  
Université de Sherbrooke



## REMERCIEMENTS

Dans le cadre de ce mémoire, je tiens tout d'abord à remercier ma directrice, P<sup>re</sup> Pascale B. Beauregard pour l'opportunité qui m'a été offerte dès mon premier stage me permettant un premier contact avec le monde de la recherche. J'ai eu la chance d'explorer plusieurs techniques et d'en apprendre davantage autant sur mon sujet de recherche que sur les expertises connexes.

Je remercie aussi mes conseillers, P<sup>re</sup> Carole Beaulieu et P<sup>r</sup> François Malouin, qui ont su me conseiller et m'orienter dans ma recherche.

Je remercie Jessica Carrier pour sa contribution par les résultats de qPCR ainsi que tous les membres du laboratoire avec qui j'ai eu la chance de travailler, ceux qui m'ont supporté et qui ont rendu toutes ces journées plus belles.

Finalement, je remercie la contribution financière du centre SÈVE et du CRSNG ce qui m'a permis de réaliser les résultats présentés dans ce mémoire ainsi que d'assister à différents congrès afin de les partager.



## SOMMAIRE

À l'état naturel, il existe des assemblages microbiens très complexes associés aux plantes et constituant le microbiote végétal. Notamment, la portion de sol entourant les racines, la rhizosphère, est une niche abritant une grande variété de microorganismes en raison de l'environnement particulièrement riche en nutriments créé par la sécrétion d'exsudats racinaires. Certaines rhizobactéries, les PGPR (*plant growth-promoting rhizobacteria*), dont *Bacillus subtilis*, possèdent des caractéristiques permettant d'améliorer la croissance des plantes, directement ou indirectement. Afin de maintenir sa relation étroite avec la plante de façon durable, *B. subtilis* colonise la rhizosphère de façon efficace par la formation d'un biofilm, une communauté multicellulaire produisant une matrice extracellulaire adhérente, qui permet de maximiser son interaction avec les tissus végétaux et persister auprès des racines. La dynamique entre l'hôte et la bactérie est particulièrement complexe puisque chacun influence l'ensemble de la communauté. Pour la plante, les exsudats racinaires sont un excellent moyen de communication avec les microorganismes de la rhizosphère. Ils peuvent moduler la composition de la communauté en favorisant certains organismes bénéfiques comme *B. subtilis* et induire le déplacement des bactéries vers la racine permettant d'établir les premières étapes de la colonisation. De plus, des polysaccharides présents à la paroi végétale sont connus comme induisant la formation du biofilm ainsi que la production d'un lipopeptide non-ribosomal, la surfactine. Cette molécule est connue pour ses effets sur la santé de la plante, mais aussi comme molécule signal chez la bactérie, notamment étant impliquée dans la formation de biofilm. Malgré les multiples études sur la surfactine, il reste beaucoup à comprendre sur son implication dans la relation avec la plante. Cette étude permet de préciser certaines interactions entre *B. subtilis* NCIB 3610 et la plante *Arabidopsis thaliana*. L'utilisation d'un rapporteur transcriptionnel de l'opéron responsable de la synthèse de surfactine lors de la formation d'un biofilm en présence de polysaccharides de plantes a permis d'observer une

induction de la transcription par la pectine. Par ailleurs, l'implication de la surfactine de *B. subtilis* dans la formation de biofilm, particulièrement en relation avec la plante, a été étudiée par la construction d'un nouveau mutant incapable de synthétiser la surfactine. Selon trois modèles d'étude de la formation du biofilm (les colonies rugueuses sur milieu solide, les pellicules et les biofilms à la surface de racines de plantes) il a été montré que la présence de la surfactine n'est pas essentielle à la formation de biofilm et n'aurait ainsi pas d'impact sur la colonisation des racines. Ces résultats montrent que l'effet positif de la surfactine sur la plante ne se fait pas via la formation du biofilm.

#### MOTS CLÉS

*Bacillus subtilis*, biofilm, matrice extracellulaire, surfactine, métabolites secondaires, PGPR, plantes, racines *Arabidopsis thaliana*, polysaccharides, pectine, xylane

# TABLE DES MATIÈRES

<b>CHAPITRE 1</b> .....	<b>1</b>
INTRODUCTION .....	1
1.1 Le microbiote végétal.....	1
1.2 La rhizosphère .....	2
1.3 Les rhizobactéries favorisant la croissance des plantes .....	5
1.4 <i>Bacillus subtilis</i> .....	6
<b>1.4.1 La colonisation des racines</b> .....	<b>9</b>
1.4.1.1 La persistance dans la rhizosphère .....	9
1.4.1.2 L'initiation de la colonisation des racines .....	10
1.4.1.3 L'établissement d'une colonisation durable des racines .....	11
<b>1.4.2 La matrice extracellulaire</b> .....	<b>11</b>
1.4.2.1 La fonction .....	12
1.4.2.2 Les composantes structurales de la matrice.....	12
1.4.2.3 Les voies de régulation .....	15
1.4.2.4 Les étapes de développement.....	16
1.4.2.5 Les types de biofilm .....	20
<b>1.4.3 L'influence de la plante</b> .....	<b>21</b>
1.4.3.1 Les nutriments .....	21
1.4.3.2 La différenciation cellulaire .....	21
1.4.3.3 Le transcriptome.....	22
1.4.3.4 Les métabolites.....	22
<b>1.4.4 Les métabolites secondaires</b> .....	<b>23</b>
1.4.4.1 Les antibiotiques.....	23
1.4.4.2 Les types de métabolites secondaires .....	24
1.4.4.3 L'implication de <i>sfp</i> .....	24
<b>1.4.5 La surfactine</b> .....	<b>25</b>
1.4.5.1 La structure.....	25
1.4.5.2 Les voies de synthèse .....	26

1.4.5.3	La biosynthèse .....	28
1.4.5.4	Les fonctions de la surfactine .....	30
1.4.5.5	L'influence de la plante sur la production de surfactine .....	33
1.5	Hypothèses et objectifs du projet de recherche .....	35
<b>CHAPITRE 2</b>	.....	<b>37</b>
	L'IMPLICATION DE LA PLANTE DANS LA PRODUCTION DE SURFACTINE CHEZ <i>BACILLUS SUBTILIS</i> .....	37
<b>2.1</b>	<b>Matériel et méthodologie</b> .....	<b>37</b>
2.1.1	Souches et milieux de culture.....	37
2.1.2	Conditions de culture et formation de biofilm .....	38
2.1.3	Essais bêta-galactosidase.....	39
<b>2.2</b>	<b>Résultats et discussion</b> .....	<b>39</b>
2.2.1	Un contrôle transcriptionnel régule la synthèse de surfactine en réponse aux polysaccharides de paroi cellulaire végétale.....	39
2.2.2	La synthèse de surfactine en réponse à la pectine est indépendante du système ComQXPA .....	41
<b>CHAPITRE 3</b>	.....	<b>45</b>
	L'IMPLICATION DE LA SURFACTINE DANS LA FORMATION DE BIOFILM CHEZ <i>BACILLUS SUBTILIS</i> - PUBLICATION SCIENTIFIQUE.....	45
3.1	Présentation de la publication .....	45
3.1.1	Résumé .....	46
3.1.2	Originalité du travail.....	46
3.1.3	Contribution des auteurs.....	47
3.1.4	Référence de l'article.....	47
3.2	Manuscrit .....	48
3.2.1	Abstract.....	48
3.2.2	Introduction .....	49
3.2.3	Material and methods.....	51
3.2.3.1	Strains, media, and chemicals.....	51
3.2.3.2	Culture conditions.....	51
3.2.3.3	Beta-galactosidase assays.....	53

3.2.3.4	Microscopy .....	53
3.2.3.5	Chemical extraction of secondary metabolites from bacterial cultures.....	54
3.2.3.6	UHPLC-HRMS analysis.....	54
3.2.3.7	Genome re-sequencing.....	55
<b>3.2.4</b>	<b>Results .....</b>	<b>55</b>
3.2.4.1	Absence of surfactin has no effect on pellicle formation of NCIB 3610 .....	55
3.2.4.2	Deletion of <i>sfp</i> and <i>srfAA</i> alters colony structure .....	57
3.2.4.3	Surfactin is not required for root colonization by <i>B. subtilis</i> .....	59
3.2.4.4	Surfactin is dispensable for pellicle and plant-associated biofilm formation in recent soil <i>B. subtilis</i> isolates .....	61
<b>3.2.5</b>	<b>Discussion .....</b>	<b>63</b>
<b>3.2.6</b>	<b>References .....</b>	<b>65</b>
<b>3.2.7</b>	<b>Supplementary data .....</b>	<b>69</b>
<b>CHAPITRE 4</b>	<b>.....</b>	<b>75</b>
	DISCUSSION ET CONCLUSION .....	75
<b>ANNEXES</b>	<b>.....</b>	<b>81</b>
<b>BIBLIOGRAPHIE</b>	<b>.....</b>	<b>83</b>



## LISTE DES ABRÉVIATIONS

°C	Degré Celsius
ABA	<i>Abscisic acid</i> (Acide abcissique)
ADN	Acide désoxyribonucléique
ADNc	ADN complémentaire
ARN	Acide ribonucléique
ARNm	Acide ribonucléique messenger
Asp	Asparagine
C	Carbone
Ct	<i>Cycle threshold</i> (Cycle de seuil)
DO	Densité optique
ET	Éthylène
g	Gramme
Gfp	<i>Green fluorescent protein</i> (Protéine fluorescente verte)
Glu	Glutamate
h	Heure
HPLC	<i>High-performance liquid chromatography</i> (Chromatographie en phase liquide à haute performance)
HRMS	<i>High Resolution Mass Spectrometry</i> (Spectrométrie de masse à haute résolution)
IAA	<i>Indole-3-acetic acid</i> (Acide indole 3-acétique)
ISR	<i>Induced systemic resistance</i> (Résistance systémique induite)
JA	Jasmonic acid (Acide jasmonique)
K <sup>+</sup>	Ion potassium
Kan	Kanamycine
KCl	Chlorure de potassium
L	Litre
LB	<i>Lysogeny broth</i>
Leu	Leucine
M	Molaire

MAMP	Motif moléculaire associé aux microbes
min	Minute
mL	Millilitre
mM	Millimolaire
mN/m	Millinewtons/mètre
MOLP	<i>Medium optimal for lipopeptide production</i> (Milieu optimal pour la production de lipopeptides)
MOPS	<i>3-(N-morpholino)propanesulfonic acid</i> (acide 3-morpholino-1-propanesulfonique)
MS	Murashige and Skoog
MSgg	<i>Minimal salts glycerol glutamate</i>
MSNc	<i>Minimal salts nitrogen cellulose</i>
NaCl	Chlorure de sodium
NRP	<i>Non-ribosomal peptide</i> (Peptide non ribosomique)
NRPS	<i>Non-ribosomal peptide synthetase</i> (Synthétase de peptides non ribosomiques)
OD	<i>Optic density</i> (Densité optique)
ONPG	Ortho-nitrophényl-β-galactoside
PAMP	<i>Pathogen-associated molecular pattern</i>
PBS	<i>Phosphate-buffered saline</i> (Tampon phosphate salin)
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i> (Réaction en chaîne par polymérase)
PGPB	<i>Plant-growth promoting bacteria</i> (Bactéries promouvant la croissance des plantes)
PGPR	<i>Plant-growth promoting rhizobacteria</i> (Rhizoactéries promouvant la croissance des plantes)
pH	Pouvoir hydrogène
PK	<i>Polyketide</i> (Polycétide)
PKS	<i>Polyketide synthetase</i> (Polycétide synthétase)
qRT-PCR	<i>Quantitative reverse transcription PCR</i> (PCR quantitative à transcription inverse)
RP	<i>Ribosomal peptide</i> (Peptide ribosomique)
RPM	<i>Revolutions per minute</i> (Révolutions par minute)
Chl <sup>R</sup>	Résistant au chloramphénicol
Spec <sup>R</sup>	Résistant à la spectinomycine

RPS	<i>Ribosomal peptide synthetase</i> (Synthétase de peptides ribosomiques)
s	Seconde
Sfp	Transférase 4'-phosphopantetheinyl Sfp
T	Temps
Tampon TE	Tampon Tris-EDTA
UHPLC	<i>Ultra-High Performance Liquid Chromatography</i> (Chromatographie liquide à ultra haute performance)
UTR	<i>Untranslated Transcribed Region</i> (Région non traduite)
V	Volume
Val	Valine
WT	<i>Wild type</i> (Souche sauvage)
Yfp	<i>Yellow fluorescent protein</i> (Protéine fluorescente jaune)
μL	Microlitre
μM	Micromolaire



# LISTE DES FIGURES

## CHAPITRE 1

### Introduction

<b>Figure 1</b>	Représentation des interactions médiées par les plantes au sein de la rhizosphère .....	4
<b>Figure 2</b>	Voies de signalisation régissant la différenciation chez <i>B. subtilis</i> .....	14
<b>Figure 3</b>	Fonctions structurales des composantes du biofilm de <i>B. subtilis</i> .....	15
<b>Figure 4</b>	Développement d'un biofilm de <i>B. subtilis</i> .....	16
<b>Figure 5</b>	Caractéristiques morphologiques et fonctionnelles du biofilm mature de <i>B. subtilis</i> .....	17
<b>Figure 6</b>	Types cellulaires présents au sein de la communauté de <i>B. subtilis</i> dans le biofilm .....	18
<b>Figure 7</b>	Types de cellules spécialisées présents dans le biofilm de <i>B. subtilis</i> .....	19
<b>Figure 8</b>	Évolution des types cellulaires différenciés au sein du biofilm au cours du temps .....	19
<b>Figure 9</b>	Développement du biofilm et modifications morphologiques au cours du temps .....	20
<b>Figure 10</b>	Structure de la surfactine .....	26
<b>Figure 11</b>	Voie de signalisation de la production de surfactine et son rôle dans la production de matrice .....	27
<b>Figure 12</b>	Aperçu des signaux et voies de contrôle médiant l'hétérogénéité de fonctions cellulaires au sein du biofilm .....	28
<b>Figure 13</b>	Assemblage de la surfactine .....	29
<b>Figure 14</b>	Mécanisme d'action de la surfactine induisant la production de matrice extracellulaire .....	32
<b>Figure 15</b>	La synthèse de la surfactine chez <i>B. amyloliquefaciens</i> est augmentée lors de la perception des polysaccharides de la paroi cellulaire .....	34

## CHAPITRE 2

### L'implication de la plante dans la production de surfactine chez *Bacillus subtilis*

<b>Figure 16</b>	Expression de $P_{srfAA}$ lors de la formation de biofilm en réponse à différentes sources de carbone .....	41
<b>Figure 17</b>	Expression de $P_{tapA}$ lors de la formation de biofilm .....	43

## CHAPITRE 3

### L'implication de la surfactine dans la formation de biofilm chez *Bacillus subtilis*

#### Publication scientifique

<b>Figure 18</b>	Pellicle formation is mildly affected by <i>srfAA</i> or <i>sfp</i> deletion .....	57
<b>Figure 19</b>	<i>srfAA</i> or <i>sfp</i> influences colony formation .....	58
<b>Figure 20</b>	Surfactin is not required for root colonization .....	60
<b>Figure 21</b>	Pellicle (in MSgg and MOLP media) and root associated biofilms of newly isolated <i>B. subtilis</i> strains (WT columns) and their respective surfactin mutants ( <i>srfAC</i> columns) .....	62

#### Matériel supplémentaire

<b>Figure S 1</b>	Pellicle formation with deletion mutants identified as containing mutations in strain SSB46 .....	69
<b>Figure S 2</b>	Impact of NRPs mutations on colony complexity .....	70
<b>Figure S 3</b>	Extracted ion chromatograms (m/z 1000-2000) showing the presence of surfactin produced by the newly isolated <i>B. subtilis</i> strains grown on MSgg agar medium and the lack of surfactin production in the <i>srfAC</i> derivatives .....	71

## ANNEXES

<b>Figure A 1</b>	Expression relative du gène de la sous-unité A de la surfactine synthétase ( <i>srfAA</i> ) .....	81
-------------------	---	----

## LISTE DES TABLEAUX

### CHAPITRE 2

L'implication de la plante dans la production de surfactine chez *Bacillus subtilis*

<b>Tableau 1</b>	Souches de <i>B. subtilis</i> utilisées dans cette étude .....	38
------------------	--	----

### CHAPITRE 3

L'implication de la surfactine dans la formation de biofilm chez *Bacillus subtilis*

Publication scientifique

<b>Table S 1</b>	Strains used in this study .....	72
<b>Table S 2</b>	Point mutations detected only in SSB46 ( <i>srfAA::erm</i> ) .....	73

## LISTE DES ÉQUATIONS

### CHAPITRE 2

L'implication de la plante dans la production de biofilm chez *B. subtilis*

<b>Équation 2-1</b>	Calcul de la valeur d'unités de Miller (A420nm/min/mL de cellules/DO600nm) .....	39
---------------------	--	----



# CHAPITRE 1

## INTRODUCTION

### 1.1 LE MICROBIOTE VÉGÉTAL

Une communauté de microorganismes, incluant différentes bactéries, champignons, protistes et autres organismes microscopiques, associée avec un hôte et vivant dans un environnement spécifique, se nomme un microbiote. Tout comme pour divers organismes hôtes, il existe des assemblages microbiens très complexes associés aux plantes, et plus précisément à des organes spécifiques de celles-ci (Compant et al., 2019). On distingue le microbiote des plantes des autres microorganismes environnant par l'influence qu'ils subissent de la plante et des autres organismes qui y sont associés. Le composant microbien du microbiote végétal se situe principalement au niveau de la rhizosphère (les racines), de la phyllosphère (les parties au-dessus du sol, i.e. les feuilles, tiges, fleurs, fruits et graines) et de l'endosphère (l'intérieur des tissus et des cellules) (Hardoim et al., 2015; Reinhold-Hurek et al., 2015; Vorholt, 2012). L'environnement riche en nutriments que la plante crée par la sécrétion d'exsudats racinaires amène une multitude de microorganismes à coloniser les environnements sous son influence ce qui mène à l'assemblage de la communauté du microbiote végétal (Haichar et al., 2014; Hardoim et al., 2015; Vorholt, 2012).

La complexité de cette dynamique provenant de l'interaction hôte-microbiote ainsi que des différents microorganismes entre eux est si importante que cela mène à définir qu'ils ne forment qu'une seule entité, l'holobionte (Lemanceau et al., 2017; Vandenkoornhuysse et al., 2015). Chacune des parties de l'holobionte influence le système, sa stabilité et ses fonctions et répond à une gamme de facteurs biotiques et abiotiques qui altère la composition microbienne (Fierer, 2017; Lemanceau et al., 2017; Vandenkoornhuysse et al., 2015).

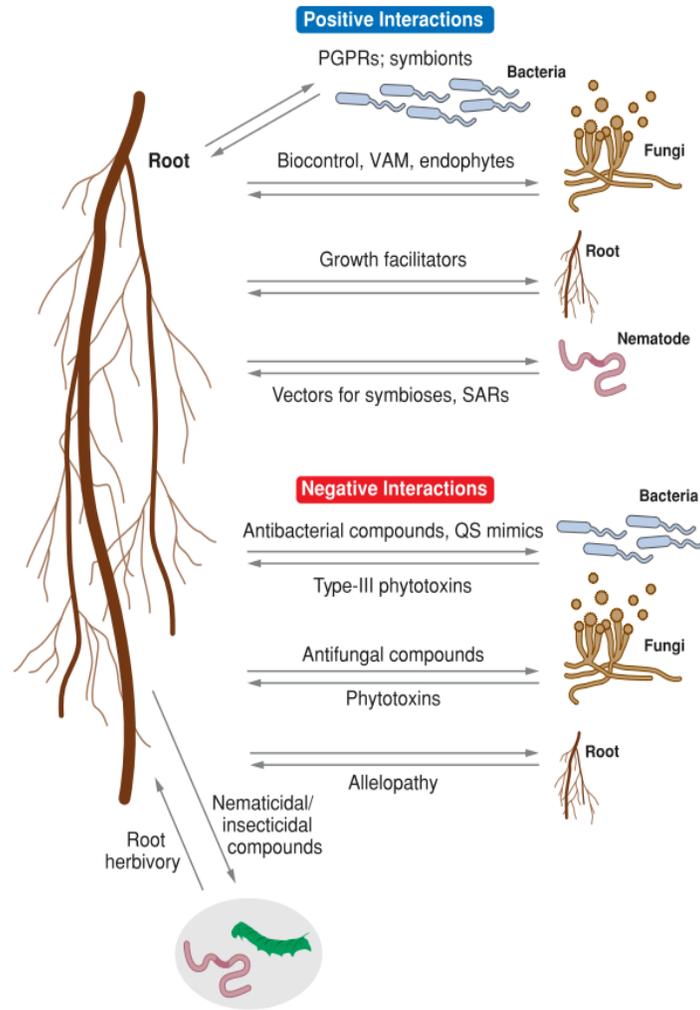
Le microbiote de la plante possède donc un potentiel fonctionnel intéressant influençant la performance de la plante (*fitness*). En outre, les mécanismes des bactéries favorisant la croissance des plantes connues comme PGPB (*plant growth-promoting bacteria*) sont particulièrement étudiés en raison de leur influence positive, directe ou indirecte, sur la plante (Compant et al., 2019). Ces mécanismes incluent sans s'y restreindre la production de phytohormones qui favorisent la croissance végétale, la sécrétion d'enzymes et d'antibiotiques qui offrent une protection contre les invasions d'agents pathogènes, la solubilisation et fixation de nutriments et l'élicitation de la résistance systémique induite de la plante hôte (Compant et al., 2019; Lemanceau et al., 2017; Pérez-García et al., 2011).

## **1.2 LA RHIZOSPHERE**

La rhizosphère, caractérisée comme l'environnement entourant les racines, influencé par celles-ci et les organismes associés, est décrite comme étant une zone particulièrement riche en microorganismes (Hartmann et al., 2008; Hiltner, 1904). La rhizosphère peut être divisée en trois zones : l'ectorrhizosphère caractérise le sol entourant les racines, la rhizoplane est la surface de celles-ci et l'endorrhizosphère, l'intérieur des tissus racinaires (Haichar et al., 2014; Hartmann et al., 2008; Reinhold-Hurek et al., 2015). Les racines sécrètent une grande quantité de nutriments, produits de la photosynthèse, sous forme d'exsudats (i.e. la rhizodéposition). On retrouve donc dans la rhizosphère diverses molécules carbonées tels que des glucides, des acides aminés, des acides organiques, des vitamines, des polysaccharides (mucilage) et des protéines, qui en font un environnement concurrentiel pour les microorganismes (Badri et Vivanco, 2009). En effet, de manière générale, le sol n'est pas particulièrement propice à la croissance bactérienne compte tenu de la présence de prédateurs, de la limitation en nutriments et de la disponibilité variable d'eau. Une faible proportion du sol est occupée par des microorganismes et leur survie est précaire. D'ailleurs, beaucoup de microorganismes s'y trouvent en dormance, sous forme de spores (Fierer, 2017). En comparaison, la rhizosphère riche en ressources constitue une niche très attrayante. Les membres de la communauté

microbienne indigène sont donc en compétition afin de s'y installer et utilisent plusieurs méthodes telle la production d'antibiotiques, afin d'être compétitifs (Compant et al., 2010). Certains de ces microorganismes développent une association étroite avec la plante, i.e. des associations mutualistes et symbiotiques, alors que d'autres, tel que des parasites et agents phytopathogènes microbiens interagiront plutôt de façon négative avec les racines (Haichar et al., 2014).

Ces interactions rhizosphériques complexes sont médiées par un système de communication plante-microbes du sol, ainsi que microbes-microbes, consistant en un échange de signaux chimiques. Ces signaux permettent aux différents organismes d'interpréter ce qui les entoure et d'émettre une réponse en conséquence. Pour la plante, cette réponse aux signaux chimiques peut la mener à inhiber les organismes indésirables ou encore sélectionner les organismes qui lui sont favorables (**Figure 1**) (Badri et Vivanco, 2009; Bais et al., 2006; Beauregard et al., 2013; Haichar et al., 2014; Hu et al., 2018; Rudrappa et al., 2008). Les exsudats racinaires sont un excellent moyen de communication avec les microorganismes de la rhizosphère car on y retrouve une grande variété de métabolites secondaires (Bais et al., 2006; Hu et al., 2018; Philippot et al., 2013). La plante possède donc une certaine capacité à être sélective dans ses interactions avec les organismes environnants et à moduler la communauté microbienne. De façon intéressante, l'effet des exsudats sur la communauté microbienne dépend de la composition en métabolites secondaires des exsudats, mais aussi des microorganismes présents.



**Figure 1 Représentation des interactions médiées par les plantes au sein de la rhizosphère**

Les composés sécrétés par la plante via la rhizodéposition permettent de moduler ses interactions avec les organismes de la rhizosphère. La composition et l'effet de ces exsudats varient selon le type d'organismes présents. Les organismes impliqués dans des interactions positives avec la plante, comme les organismes bénéfiques (e.g. les PGPB), seront favorisés, alors que les organismes impliqués dans des interactions négatives, comme les organismes nuisibles (e.g. les agents pathogènes), seront inhibés. Figure tirée de Bais et al. (2006)

La composition des exsudats racinaires est régulée par les différents facteurs biotiques et abiotiques menant à des combinaisons de molécules chimiques ayant différents effets sur les microorganismes (Badri et Vivanco, 2009; Jones et al., 2004). Les nutriments contenus dans les exsudats créent un environnement riche en carbone et attirent les organismes du sol en

induisant la chimiotaxie (Allard-Massicotte et al. 2016) alors que les antimicrobiens et les toxines inhibent la présence ou l'invasion de certains organismes pathogènes (Bais et al., 2004a). En outre, des rhizobactéries favorisant la croissance des plantes (*plant growth-promoting rhizobacteria* : PGPR) colonisent la rhizosphère de façon efficace. Ils remplissent des fonctions importantes pouvant favoriser la santé et la croissance des plantes de diverses manières (Bhattacharyya et Jha, 2012). Ainsi, ces relations conduisent à des avantages tant pour la plante que pour la bactérie.

### **1.3 LES RHIZOBACTÉRIES FAVORISANT LA CROISSANCE DES PLANTES**

Certaines rhizobactéries, les PGPR (*plant growth-promoting rhizobacteria*), possèdent des caractéristiques permettant d'améliorer la croissance des plantes directement ou indirectement de multiples façons (Bloemberg et Lugtenberg, 2001). Les différents mécanismes impliqués comprennent la biofertilisation, c'est-à-dire la stimulation de la croissance par l'augmentation de l'apport en nutriments ou par la synthèse de molécules promotrices de croissance telles des hormones; le biocontrôle ou l'inhibition de ravageurs et d'agents phytopathogènes par des traits biopesticides; et la bioremédiation favorisant le développement de la plante par la protection contre certaines molécules toxiques ou la dégradation de composants xénobiotiques améliorant l'environnement de la plante (Ahemad et Kibret, 2014; Bhattacharyya et Jha, 2012; Braud et al., 2009; Pérez-García et al., 2011; Weselowski et al., 2016).

Afin de maintenir leur relation étroite avec la plante de façon durable, les PGPR doivent coloniser la rhizosphère de façon efficace (Danhorn et Fuqua, 2007). Ainsi, la plupart de celles-ci coloniseront directement la rhizoplane, et même l'endorhizosphère, dans l'optique de maximiser leur interaction avec les tissus végétaux (Bhattacharyya et Jha, 2012). Par ailleurs, plusieurs espèces coloniseront sous forme d'une communauté multicellulaire complexe entourée d'une matrice extracellulaire; les biofilms (Chen et al., 2012a; Townsley et al., 2018;

Vlamakis et al., 2013). Les biofilms permettront d'assurer une proximité entre les parties et de protéger cette communauté, mais aussi offriront une protection supplémentaire à la plante (Vlamakis et al., 2013).

Compte tenu des bénéfices tirés de ces rhizobactéries et de la situation environnementalement précaire de l'exploitation agricole, un marché s'est ouvert pour l'utilisation commerciale de ces microorganismes en tant que biofertilisants dans l'optique d'améliorer la croissance des cultures et de contrôler les agents pathogènes des plantes de façon écologique (Bhattacharyya et Jha, 2012). Connaissant maintenant les effets négatifs associés aux fertilisants et pesticides chimiques sur l'écosystème (Carvalho, 2017; Sabarwal et al., 2018), cette alternative basée sur l'interaction plante-microorganismes semble prometteuse.

Parmi les organismes étudiés pour leur potentiel en tant qu'alternative aux différents produits synthétiques traditionnellement utilisés en agriculture, on retrouve des *Azospirillum*, *Azotobacter*, *Bacillus*, *Enterobacter*, *Klebsiella*, *Pseudomonas*, utilisés comme bioinoculants (Bashan et De-Bashan, 2002; Gupta et al., 2020; Lucy et al., 2004; Ongena et al., 2007; Van Oosten et al., 2018; Pérez-García et al., 2011; Sapre et al., 2018; Sipahutar et al., 2018; Zhou et al., 2019). Cependant, le manque actuel de compréhension fondamentale limite la constance des résultats obtenus de leur utilisation dans divers agrosystèmes, ce qui explique la multitude d'études portées sur les mécanismes sous-jacents le fonctionnement de ces bioinoculants et leur applicabilité.

#### **1.4 BACILLUS SUBTILIS**

*Bacillus subtilis* est une espèce bactérienne présente de façon ubiquitaire dans l'environnement et plus particulièrement dans le sol où elle se trouve souvent associée aux racines de différentes espèces de plantes (Abdelzaher, 2003; Cazorla et al., 2007; Chen et al.,

2012a; Huang et al., 2017). Cette bactérie non-pathogène est caractérisée comme faisant partie des PGPR car elle peut induire des effets positifs à la plante hôte via plusieurs mécanismes.

Dans le sol, *B. subtilis* fait face à plusieurs autres microorganismes qui compétitionnent pour cette niche. Ainsi, plusieurs mécanismes lui permettent non seulement d'interférer avec la croissance des autres microorganismes, mais aussi de favoriser sa relation avec la plante. *B. subtilis* possède l'habilité de coloniser efficacement les racines (Compant et al., 2010), obtenant un apport concurrentiel en nutriments, ce qui augmente son efficacité (*fitness*) par rapport aux autres microorganismes (Arkhipova et al., 2005; Bais et al., 2004b; González-Jaramillo et al., 2017; Kinsella et al., 2009; Ongena et al., 2007; Rudrappa et al., 2010; Zhang et al., 2007).

*B. subtilis* produit des molécules, dont des cytokines (e.g. zéatine riboside) et des phytohormones de croissance (e.g. acide indole 3-acétique; IAA), qui sont absorbées par les racines et modifient le contenu hormonal de la plante. Cette modification affecte positivement principalement l'acide indole 3-acétique (IAA) et l'acide abscissique (ABA), ce qui favorise la croissance de la plante (Araújo et al., 2005; Arkhipova et al., 2005; Egorshina et al., 2012; Mohite, 2013; Ryu et al., 2004; Wu et al., 2015). Certains composés volatils émis par la bactérie mènent aussi aux mêmes effets en modulant la production de phytohormones associées à la croissance chez la plante (Ryu et al., 2004; Zhang et al., 2007).

Plus indirectement, *B. subtilis* favorise l'acquisition de ressources en rendant biodisponibles une quantité de différents nutriments. Notamment, elle promeut la fixation de l'azote (Kuan et al., 2016), permet la solubilisation du phosphate et chélate le fer grâce à ses sidérophores (Kohler et al., 2007; Peralta et al., 2012).

D'autre part, la susceptibilité de la plante à une infection potentielle est diminuée par la présence de *B. subtilis* dans la rhizosphère. Par la production et sécrétion de composés organiques, par exemple de l'acétoïne et des lipopeptides, cette bactérie provoque une réponse immunitaire chez la plante via les voies de signalisation de l'acide abscissique (ABA), de l'acide jasmonique (JA), de l'éthylène (ET) et de l'auxine, ce qui élicite la résistance systémique induite contribuant à la défense de celle-ci (Chandler et al., 2015; Ongena et al., 2007; Rudrappa et al., 2010; Tunsagool et al., 2019). Cette défense est amplifiée par la sécrétion par *B. subtilis* d'antimicrobiens tels que la surfactine, la fengycine et l'iturine, et d'agents de biocontrôle tels que des enzymes hydrolytiques, dont des glucanases, des chitinases et des protéases (Bais et al., 2004b; Cazorla et al., 2007; González-Jaramillo et al., 2017; Kinsella et al., 2009).

En plus d'aider la plante à faire face aux stress biotiques que représentent les agents phytopathogènes, *B. subtilis* contribue à sa tolérance à différents stress abiotiques. C'est le cas notamment de la résistance aux conditions de sécheresse (Zhang et al., 2008).

De ses propriétés de biofertilisant, de biopesticide et biofongicide, *B. subtilis* est un organisme d'intérêt en biotechnologie agricole (Bhattacharyya et Jha, 2012; Pérez-García et al., 2011) ayant d'ailleurs été commercialisé en tant que biofongicide (Aloo et al., 2019; Hinter, 2011; Pérez-García et al., 2011). Ces produits, entre autres commercialisés par la compagnie Bayer, se présentent sous forme de préparation d'endospores afin d'obtenir une population bactérienne stable permettant la conservation du produit. La fermentation précédant la sporulation produit plusieurs molécules fongicides et bactéricides ainsi que des hormones de croissance végétale. L'application de la solution aqueuse en terre permet de répandre les diverses molécules bénéfiques précédemment produites, mais entraîne aussi la germination des spores et la colonisation de la plante favorisant son développement. Cependant, il reste beaucoup à comprendre en ce qui a trait à ce produit afin d'obtenir une alternative fiable en matière d'agriculture biologique. Ces produits s'avèrent souvent efficaces dans un

environnement contrôlé, mais les résultats sont variables et incohérents dans les essais sur le terrain. Pour cette raison, une multitude d'études sur *B. subtilis*, qui plus est un organisme modèle pour différents mécanismes microbiens, sont présentement en cours.

#### 1.4.1 LA COLONISATION DES RACINES

##### 1.4.1.1 La persistance dans la rhizosphère

*B. subtilis* peut adopter des formes alternatives (et exclusives) dans son développement par une différenciation en des types de cellules spécialisées, soit en cellules planctoniques, en spores et en cellules productrices de biofilm. Ces différenciations ont lieu par l'entremise de voies de signalisation cellulaire spécifiques en réponse à des signaux environnementaux et physiologiques permettant l'adaptation de la population (Compant et al., 2010)(Grau et al., 2015; Yan et al., 2016).

La formation d'endospores est une stratégie de survie qui permet d'entrer dans un état de dormance sous une forme hautement résistante afin de faire face aux conditions difficiles pouvant survenir dans l'environnement, dans ce cas-ci la rhizosphère (Stragier et Losick, 1996). En raison de la multitude d'organismes présents dans le sol, des diverses combinaisons de produits sécrétés par la plante et des variations de conditions environnementales, cet espace entourant les racines est particulièrement et constamment changeant (Mendes et al., 2013). Alors que certaines de ces conditions de croissance défavorables éliminent ou entraînent la migration d'autres organismes, la sporulation permet à *B. subtilis* de survivre et persister jusqu'à ce que des conditions acceptables pour la croissance végétative soient remplies (Igarashi et Setlow, 2006). Plus précisément, un bas niveau de nutriments et une densité cellulaire importante sont des facteurs pouvant déclencher, par l'entremise des kinases membranaires KinA-E, le processus de formation d'endospores (McLoon et al., 2011; Meeske et al., 2016). Quant à la germination, elle peut être induite par plusieurs nutriments ainsi que des produits sécrétés par la plante (Charron-Lamoureux et Beauregard, 2019; Igarashi et

Setlow, 2006) sentis par les récepteurs de germination GerA, GerB et GerK (Atluri et al., 2006). Ces conditions favorables, agissant comme signaux, entraineront les spores à germer et retourner vers la forme planctonique permettant à la population bactérienne de rétablir sa croissance en lui offrant une certaine exclusivité spatiale de la niche et de son hôte.

Outre les stress abiotiques, la rhizosphère demeure un environnement complexe par la présence d'une communauté composée de diverses espèces de microorganismes. Ainsi, la production de divers antibactériens et antifongiques, notamment la bacillaene, l'iturine, la fengicine et la surfactine (Kim et al., 2010), de toxines et de molécules inhibitrices de molécules signal (Devi et al., 2018) permettent à *B. subtilis* de compétitionner contre les autres espèces bactériennes et d'échapper à la prédation.

#### 1.4.1.2 L'initiation de la colonisation des racines

Afin d'être en mesure de coloniser efficacement son hôte, *B. subtilis* doit établir un contact avec les racines de la plante en vue de s'y établir. La motilité flagellaire de la bactérie planctonique joue un rôle essentiel pour les premiers contacts avec la racine (Allard-Massicotte et al. 2016). Celle-ci est médiée par son environnement et lui permet de se diriger par chimiotaxie selon des gradients, vers des molécules attractives ou loin des molécules répulsives. La réponse aux exsudats racinaires mènera donc aux premières interactions avec la plante. Par l'entremise de ses récepteurs McpB, McpC et TlpC, *B. subtilis* est attiré par les exsudats racinaires (Allard-Massicotte et al., 2016). Parmi les ligands des récepteurs de *B. subtilis*, on retrouve des acides aminés et des sources de carbone (Badri et Vivanco, 2009). Bien que les exsudats racinaires contiennent des composés particulièrement riches, la chimiotaxie n'est pas forcément menée en fonction de leur valeur nutritive, laissant suggérer que la tendance leur permettrait de non seulement localiser des nutriments, mais aussi de répondre à des signaux environnementaux la dirigeant vers un endroit favorable, dans ce cas-ci la racine (Yang et al., 2015). Ce déplacement facilite le premier contact qui permettra à *B. subtilis* de s'établir sur la racine et d'instituer une relation mutualiste avec la plante.

#### 1.4.1.3 L'établissement d'une colonisation durable des racines

Par ailleurs, la relation bénéfique entre la plante et la bactérie dépend de leur capacité à cohabiter. Dans cette optique, *B. subtilis* possède des caractéristiques lui permettant d'échapper à la défense de la plante. Entre autres, elle produit la subtilomycine qui se lie à la flagelline affectant la défense des plantes induite par le fragment flg22 qui agit comme MAMP (*Microbe-associated molecular pattern*). Cela permet une diminution de la réponse immunitaire et favorise la colonisation (Deng et al., 2019).

À plus long terme, cette relation dépendra de la capacité de la bactérie à établir un contact durable avec la racine. La caractéristique lui permettant d'atteindre cela requiert une différenciation cellulaire menant à la formation de biofilm. (Bais et al., 2004b; Chen et al., 2012b).

#### 1.4.2 LA MATRICE EXTRACELLULAIRE

*B. subtilis* est largement étudiée comme organisme modèle chez les Gram-positifs pour sa capacité à former un biofilm. Le biofilm bactérien est une structure multicellulaire complexe constituée d'une communauté de microorganismes qui peut être mono- ou multi-espèces. Cet assemblage structuré, formé d'une matrice extracellulaire auto-produite par les microorganismes qu'elle abrite, permet l'attachement de ces organismes entre eux ainsi qu'une adhésion à une surface, qu'elle soit solide ou liquide (Danhorn et Fuqua, 2007). Il s'agit d'un environnement très hétérogène qui procure aux organismes un environnement protégé et bénéfique à la population.

Principalement, on retrouve dans le biofilm, en plus des divers microorganismes, des produits excrétés de façon extracellulaire qui forment la matrice. Cette matrice est composée d'exopolysaccharides, d'ADN extracellulaire, de fibres amyloïdes et d'autres protéines (Branda et al., 2005; Flemming et Wingender, 2010). Cette structure sociale repose sur la production

et la sécrétion de ces composantes, dont plusieurs possèdent un coût métabolique important et sont considérés comme des biens communs bénéficiant à l'ensemble de la communauté (Cairns et al., 2014).

#### 1.4.2.1 La fonction

Dans ce contexte, la formation de biofilm, en maintenant une masse cellulaire compacte dans la rhizoplane, permet une couverture efficace de la racine et donc un meilleur accès aux nutriments ainsi qu'à un échange efficace de molécules signal entre la population bactérienne et la plante (Danhorn et Fuqua, 2007). Outre cette fonction, cette structure permet de faire face à différents stress dont la prédation, les antimicrobiens, la sécheresse et l'humidité et la pénétration de composés toxiques (gaz, solvants, biocides) (Danhorn et Fuqua, 2007; Epstein et al., 2011; Molina-Santiago et al., 2019; Werb et al., 2017). Ce site, où se retrouve une forte densité cellulaire, est aussi idéal pour l'échange entre les individus. On y retrouve du partage de matériel génétique menant au transfert horizontal de gènes, de métabolites et d'enzymes pouvant être utilisées par l'ensemble de la population. Finalement, le biofilm contient des molécules ayant des fonctions signalétiques permettant une communication au sein de la population (*quorum sensing*) (Algburi et al., 2016; Danhorn et Fuqua, 2007). Cela permet une synchronisation du comportement des cellules bactériennes entre elles, mais aussi avec la plante.

#### 1.4.2.2 Les composantes structurales de la matrice

La différenciation en cellule productrice de matrice extracellulaire est régulée en réponse à différents signaux externes et physiologiques. *B. subtilis* possède des gènes encodant plusieurs réseaux d'intégration de signaux permettant aux cellules individuelles de répondre à l'environnement et à leur état métabolique (Shank et Kolter, 2011). La plus importante protéine régulatrice est Spo0A, nécessaire à toutes les formes de développement (Chai et al., 2011; Hamon et Lazazzera, 2001).

Lors de la production de la matrice extracellulaire, il y a répression de l'expression des gènes de motilité et activation des gènes impliqués dans la production de matrice extracellulaire (**Figure 2**). Ainsi, chaque type de cellules différenciées est exclusif l'un de l'autre (Vlamakis et al., 2008). Ce contrôle étroit des programmes de différenciation cellulaire permet de réguler la transcription de gènes spécifiques menant à la production de composants métaboliquement coûteux (Cairns et al., 2014). Parmi ces gènes, les plus importants sont ceux contenus dans les opérons *epsA-O* et *tasA-sipW-tapA*. Le premier contient des gènes responsables de la synthèse de grands exopolysaccharides, ce qui permet la formation de la matrice. Le deuxième contient les gènes permettant la production de la protéine TasA qui, une fois polymérisée, forme des fibres amyloïdes (*amyloid like fibers*), aussi constituantes de la matrice et qui lui donne sa structure et sa rigidité (**Figure 3**) (Branda et al., 2006; Romero et al., 2010). Une autre protéine, BslA, fait aussi partie des composants principaux de la matrice extracellulaire produite par *B. subtilis*. Il s'agit d'une hydrolysine auto-polymérisée formant un film élastique localisé à l'interface du biofilm (Hobley et al., 2013). Par ses capacités, celle-ci donne au biofilm son importante hydrophobicité. Elle contribue grandement à l'étanchéité de celui-ci, protégeant les microorganismes, mais aussi les racines, de différents stress en limitant la pénétrance de liquides et de gaz (Arnaouteli et al., 2016; Kobayashi et Iwano, 2012). Lors de l'assemblage du biofilm, elle agit en synergie avec les autres composants, les exopolysaccharides et TasA, pour mener à une structure organisée et solide. Chacun de ces composants est essentiel à la formation de la matrice. Cependant, afin de réduire les coûts métaboliques au sein de la population, chaque ressource peut être partagée entre les producteurs et les non-producteurs de ces biens communs (Beauregard et al., 2013; Branda et al., 2006; Ostrowski et al., 2011) .

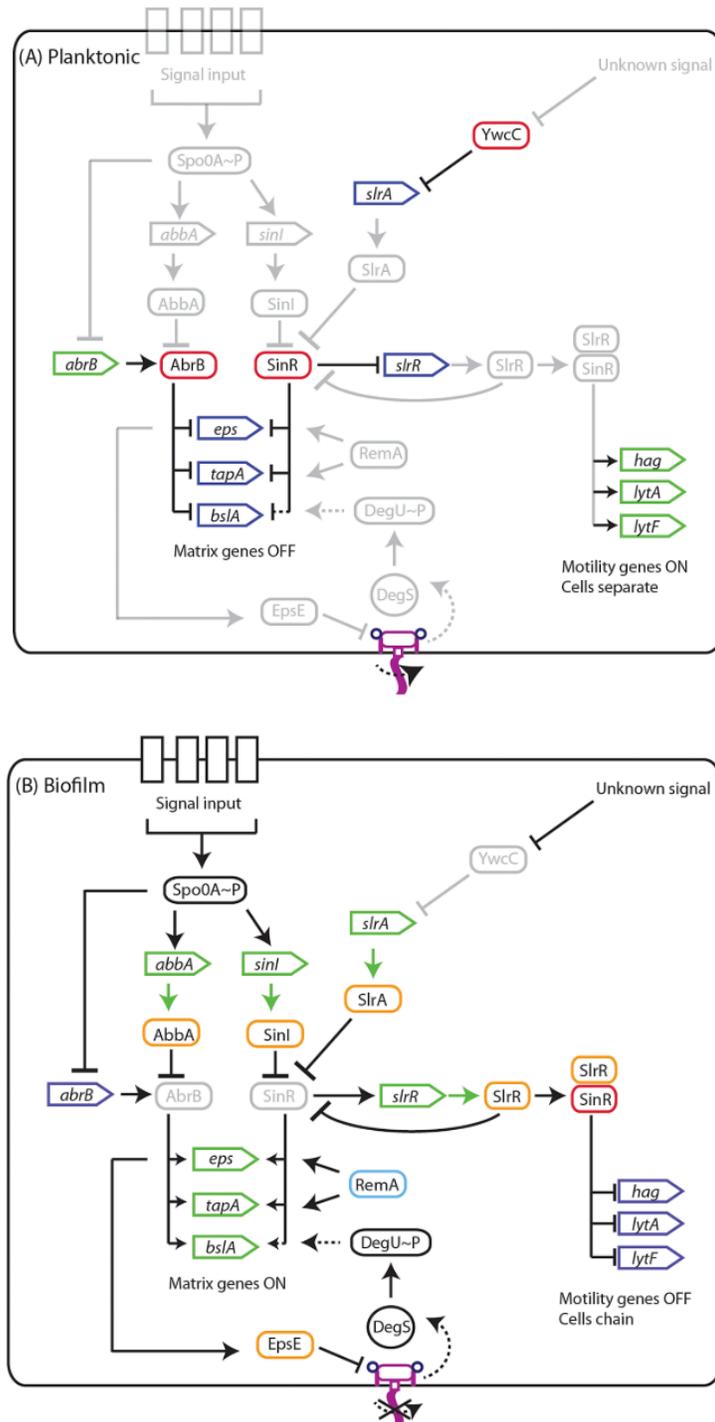
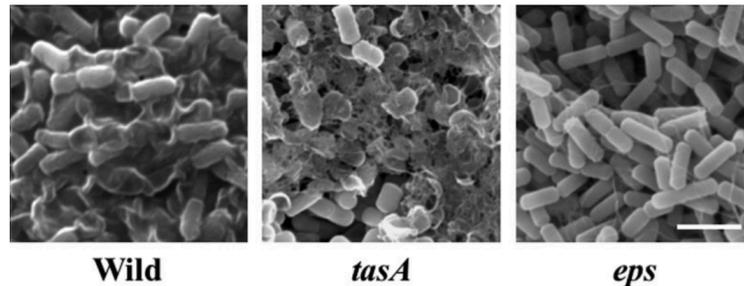


Figure 2 Voies de signalisation régissant la différenciation chez *B. subtilis*

Schéma des voies de régulation lors de la croissance (A) planctonique et (B) en tant que biofilm. Les composants en gris indiquent les parties des voies qui sont inactives. Figure tirée de Cairns et al. (2014)



**Figure 3 Fonctions structurales des composantes du biofilm de *B. subtilis***

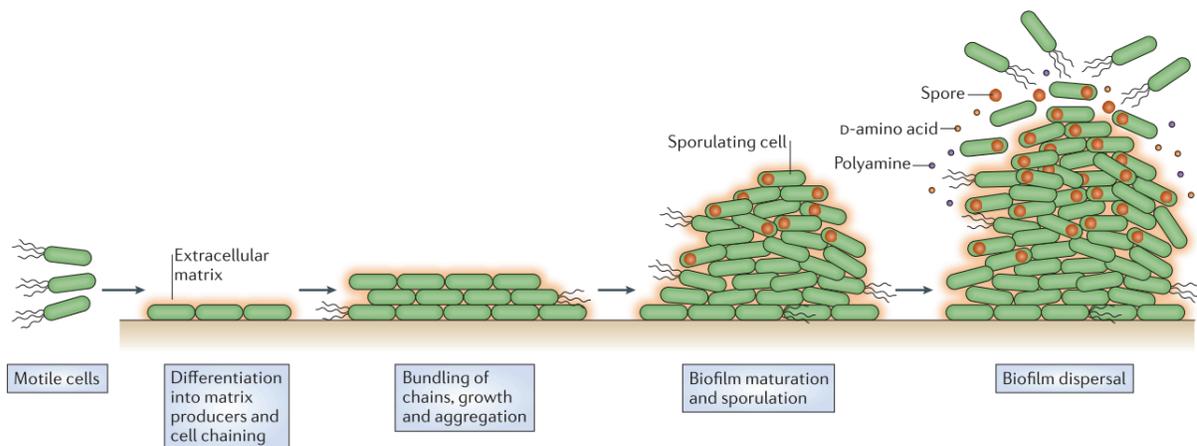
Microscopie électronique à balayage d'un biofilm constitué d'une souche de *B. subtilis* sauvage (*Wild*) ou des mutants pour les opérons *epsA-O* (*eps*) ou *tasA-sipW-tapA* (*tasA*). Le grossissement est de 10 000 X. La barre d'échelle est de 200  $\mu\text{m}$ . Figure tirée de Branda et al. (2006)

#### 1.4.2.3 Les voies de régulation

La transcription des opérons *epsA-O*, *tasA-sipW-tapA* ainsi que *bslA* est contrôlée par le niveau intracellulaire de Spo0A phosphorylé (Spo0A~P), le régulateur de transcription central. Cette phosphorylation est faite selon une régulation directe ou indirecte (par phosphorelais) par l'entremise de 5 kinases (KinA-E) en réponse à différents signaux extracellulaires physiologiques ou environnementaux (Elsholz et al., 2014; Grau et al., 2015). Selon le niveau cellulaire de Spo0A~P atteint, il y a activation ou inhibition de la transcription des gènes relatifs à la motilité, à la formation de biofilm et à la sporulation (Chai et al., 2011). Plus précisément, pour la formation de biofilm, une concentration cellulaire intermédiaire de Spo0A~P agit par deux voies parallèles d'antirépresseurs, i.e. l'inhibition du répresseur AbrB et la transcription de l'antirépresseur SinI (Cairns et al., 2014; Chu et al., 2008). L'antirépresseur SinI inhibe SinR qui est un répresseur de la formation de biofilm (Fujita et al., 2005). Il y aura donc une levée d'inhibition par SinR ce qui permettra la transcription des opérons *epsA-O* et *tapA-sipW-tasA* et de *bslA* menant à la production de matrice extracellulaire (Chu et al., 2008). Le même principe se produira pour la voie parallèle d'*abrB*. Cette régulation très précise assure une coordination de l'expression des gènes de production de matrice (Cairns et al., 2014).

#### 1.4.2.4 Les étapes de développement

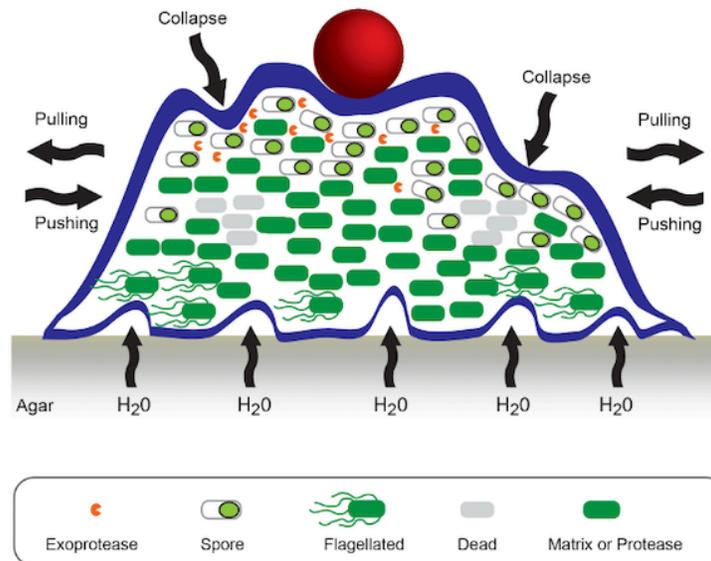
La formation d'un biofilm mature implique plusieurs étapes (**Figure 4**). L'agglomération débute par des changements morphologiques, c'est-à-dire, la création de chainettes de bacilles, créées de cellules divisées, mais connectées par la paroi cellulaire (Branda et al., 2006). La sécrétion de matrice extracellulaire par les cellules productrice de matrice permet de tenir les cellules entre elles et de former des amas (Vlamakis et al., 2013).



**Figure 4 Développement d'un biofilm de *B. subtilis***

Les cellules végétatives motiles répriment la transcription des gènes de motilité et activent celle des gènes de production de matrice. Les cellules divisées arrêtent de se séparer, formant des chainettes. L'accumulation de chainettes forme un amas de cellules et la production de matrice extracellulaire permet la maturation du biofilm. Finalement, suivant certains signaux, il y a décomposition du biofilm et dispersion des spores. Figure tirée de Vlamakis et al. (2013)

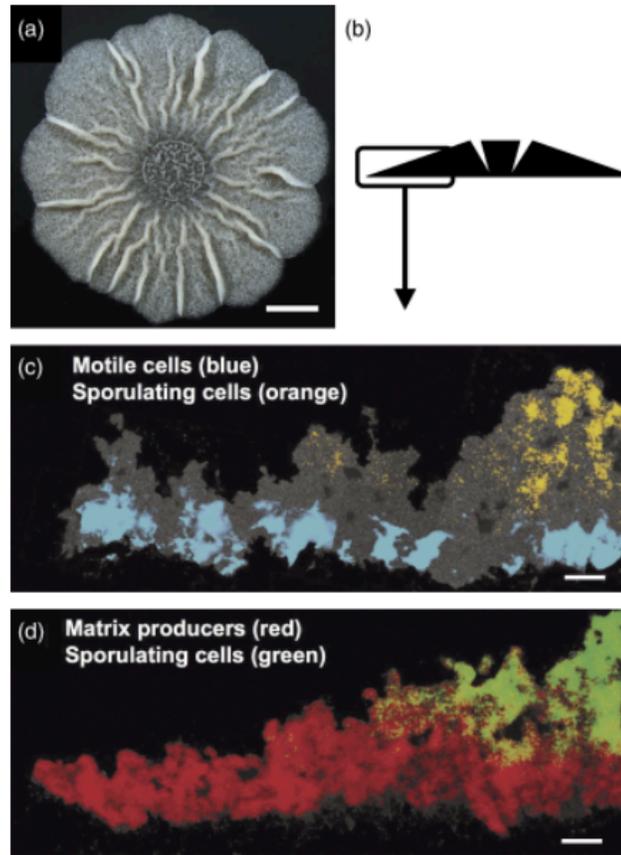
Parmi les composantes produites, les exopolysaccharides ainsi que des surfactants bactériens permettront la diffusion de nutriments et autres molécules (Angelini et al., 2009; Kearns et Losick, 2003; Seminara et al., 2012), alors que TasA donnera son intégrité structurelle au biofilm et permettra un attachement solide à la surface par l'entremise de TapA (Romero et al., 2010, 2011). La protéine BslA formera une pellicule souple et hydrophobe qui recouvre les autres constituants à la surface de la colonie (**Figure 5**) (Arnaouteli et al., 2016; Hopley et al., 2013).



**Figure 5** Caractéristiques morphologiques et fonctionnelles du biofilm mature de *B. subtilis*

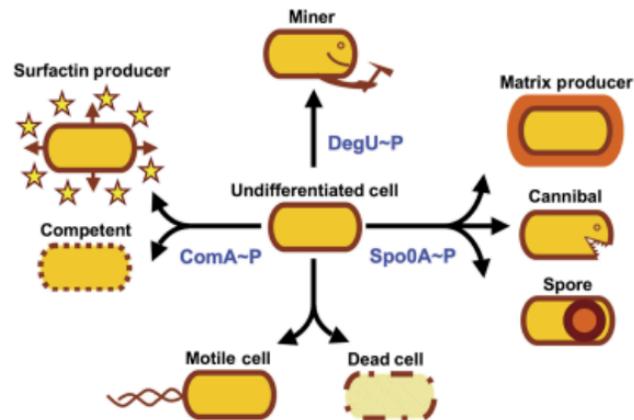
La protéine BslA constitue la couche externe (en bleu) et contribue à l'hydrophobicité du biofilm alors que TasA et Eps forment la structure à l'intérieur de cette couche. L'hydrophobicité de la structure est illustrée par la boule rouge représentant une goutte d'eau. Des forces mécaniques transmises par la matrice du biofilm poussent ou tirent la communauté permettant la dispersion (représentées par les flèches horizontales). Les canaux au bas de la colonie permettent aux liquides de circuler. La différenciation cellulaire contribue à la formation du biofilm et la mort cellulaire localisée est impliquée dans la formation des rides. Figure tirée de Cairns et al. (2014)

En réponse à plusieurs signaux reçus par les régulateurs Spo0A, DegU et ComA, il y a différenciation de la population isogénique en sous-groupes localisés de cellules dont l'expression des gènes diffère, contribuant ainsi à la formation d'une structure complexe (**Figure 6**) (López et Kolter, 2010). Comme chacun de ces sous-groupes joue un rôle bien précis dans le développement du biofilm (**Figure 7**), ce phénomène permet de réduire le coût métabolique pour les cellules individuelles tout en exprimant de nombreuses caractéristiques dans la population, maximisant la productivité (Kearns, 2008; López et Kolter, 2010). Ces différenciations n'étant pas définitives, les cellules peuvent se différencier à nouveau selon l'évolution de la communauté (**Figure 8**).



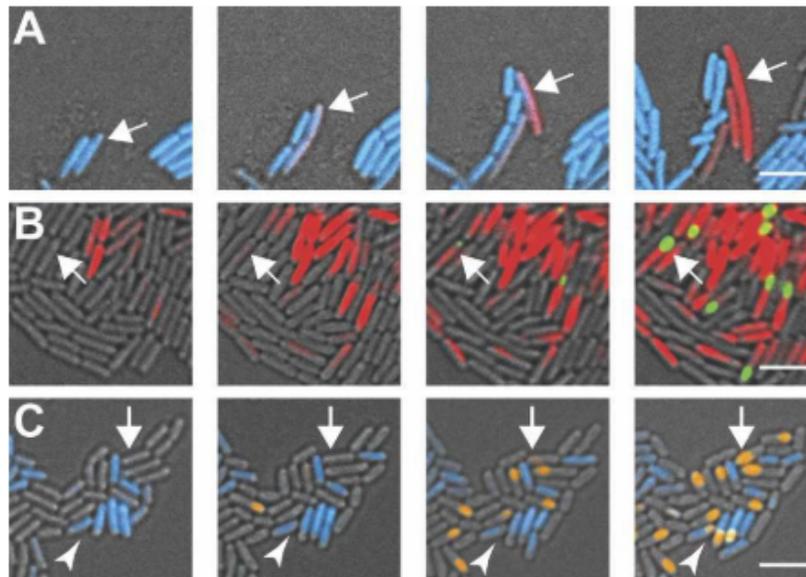
**Figure 6** Types cellulaires présents au sein de la communauté de *B. subtilis* dans le biofilm.

**(A)** Photographie d'un biofilm de *B. subtilis* à 72 h de croissance sur milieu MSgg. La barre d'échelle mesure 1 mm. **(B-D)** La communauté bactérienne du biofilm se différencie en sous-populations distinctes de cellules spécialisées. **(C, D)** Images d'une couche d'un biofilm de *B. subtilis* NCIB 3610 à 48 h de croissance sur milieu MSgg montrant la localisation spatiale de cellules motiles (en bleu), de spores (en orange et vert) et de cellules productrices de matrice (en rouge). La barre d'échelle est de 50mm. Figure tirée de López et Kolter (2010) ayant été modifiée de Vlamakis et al. (2008)



**Figure 7** Types de cellules spécialisées présents dans le biofilm de *B. subtilis*

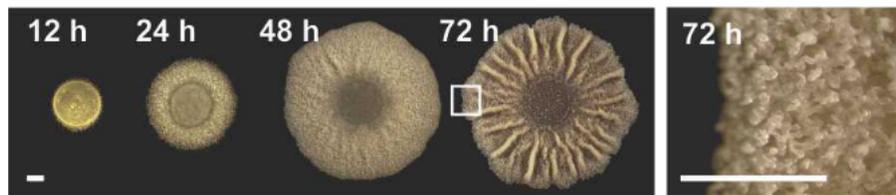
La combinaison de l'expression bimodale des gènes impliqués dans la différenciation cellulaire de *B. subtilis* entraîne la création d'une population aux rôles hétérogène au sein du biofilm. Figure tirée de López et Kolter (2010)



**Figure 8** Évolution des types cellulaires différenciés au sein du biofilm au cours du temps

(A) Images de cellules motiles ( $P_{hag-cfp}$ ; en bleu) et productrices de matrice ( $P_{tapA-yfp}$ ; en rouge). La flèche pointe une cellule motile en différenciation vers la production de matrice. (B) Images de cellules productrices de matrice ( $P_{tapA-yfp}$ ; en rouge) et de spores ( $P_{sspB-yfp}$ ; en vert). La flèche pointe une cellule productrice de matrice en transition vers la production de spores. (C) Images de cellules motiles ( $P_{hag-cfp}$ ; en bleu) et de spores ( $P_{sspB-yfp}$ ; orange). La flèche indique une cellule motile en différenciation vers la production de spores. La barre d'échelle est de 5  $\mu$ m. Figure tirée de Vlamakis et al. (2008)

L'accumulation de cellules mortes contribue à la morphologie de cette structure, créant des rides à la surface de la colonie (**Figure 5**) et (**Figure 9**) (Asally et al., 2012). De plus, un réseau de canaux est formé, permettant la circulation de liquides et la distribution de nutriments dans les endroits moins accessibles du biofilm (Wilking et al., 2013). Finalement, en fonction des conditions et de divers signaux (conditions, nutriments, etc.) , l'évolution du biofilm se terminera par la dégradation de la matrice par des protéases et son désassemblage, entraînant les spores à se disperser (Branda et al., 2001).



**Figure 9 Développement du biofilm et modifications morphologiques au cours du temps**

Les photographies montrent la vue de dessus du développement du biofilm de *B. subtilis* NCIB 3610 sur milieu MSgg. L'image de droite permet de visualiser les structures aériennes du biofilm à 72 h de croissance. La barre d'échelle est de 1 mm. Figure tirée de Vlamakis et al. (2008)

#### 1.4.2.5 Les types de biofilm

Il existe plusieurs types de biofilm produits par *B. subtilis* selon l'environnement dans lequel la population croit. Le biofilm constitué d'une population sur un milieu solide forme une macro-colonie robuste et texturée (Vlamakis et al., 2013). En milieu liquide, *B. subtilis* peut former des biofilms sur une surface solide de façon submergée (Hamon et Lazazzera, 2001) ou, plus fréquemment, des pellicules flottant à l'interface air-liquide (Branda et al., 2001). Bien qu'ils soient d'apparence différente et que leur processus de formation varie en fonction des conditions, les données recueillies concernant ces biofilms démontrent que la plupart des composantes et des voies de signalisations principales impliquées sont similaires (Bridier et al., 2011; Chai et al., 2009; Chu et al., 2006; Hamon et Lazazzera, 2001). Comme mentionné, *B. subtilis* est un important modèle d'étude pour la formation de biofilm chez les Gram-positif. Les études actuelles portant sur la formation de matrice extracellulaire chez *B. subtilis* se font

majoritairement selon 3 modèles: les colonies rugueuses sur un milieu solide gélosé, les biofilms à l'interface air-liquide (les pellicules), et finalement, comme il s'agit d'une espèce bactérienne connue pour s'associer avec les plantes, les biofilms à la surface de racines de plantes (Beauregard et al., 2013; Chen et al., 2012b; Zerouh et al., 2014). En plus de permettre l'utilisation d'un modèle d'étude plus près de la réalité, cette dernière méthode est particulièrement intéressante pour l'étude de la relation bénéfique entre les bactéries et la plante.

### 1.4.3 L'INFLUENCE DE LA PLANTE

#### 1.4.3.1 Les nutriments

Les plantes influencent de plusieurs manières la population de *B. subtilis* dans la rhizosphère. De façon naturelle, la plante relâche plusieurs composés, dont des produits de photosynthèse, par la rhizodéposition au niveau des racines. Il y a donc une importante libération de carbone par les cellules épidermiques et corticales racinaires entraînant des changements chimiques de cet endroit précis du sol, soutenant la croissance des microorganismes présents dans le milieu (Bais et al., 2006; Reinhold-Hurek et al., 2015). Elles sont aussi connues comme influençant positivement la biodisponibilité de certains nutriments essentiels (fer, phosphore, etc.) dans le sol par la sécrétion d'acides organiques et de phytosidérophores (Bais et al., 2006).

#### 1.4.3.2 La différenciation cellulaire

Le processus de synthèse de matrice extracellulaire et de formation du biofilm se produit en réponse à différents signaux externes. De ce fait, la présence de racines de plantes ou d'extraits de racines permet d'induire la production du biofilm de *B. subtilis* (Beauregard et al., 2013; Chen et al., 2012b; Rudrappa et al., 2008). Cette induction est médiée par certains composés présents dans les exsudats racinaires comme l'acide malique, ainsi que par la présence de certains polysaccharides à la surface des racines, sur les parois cellulaires, tels que le xylane, la

pectine ou l'arabinogalactane. Ces polymères peuvent de plus être métabolisés et utilisés comme nutriment et sources de carbone supplémentaires (Beauregard et al., 2013).

Par ailleurs, la plante a une incidence sur plusieurs processus de différenciation. En plus d'induire la formation de biofilm, les nutriments qu'elle produit peuvent créer des conditions favorables induisant la germination. Certains nutriments spécifiques, comme l'asparagine, le glucose, le fructose, et le potassium, sont des germinants connus (Stewart et al., 2012). Finalement, en contact avec *B. subtilis*, les exsudat racinaires peuvent induire la sporulation de la bactérie (Charron-Lamoureux et Beauregard, 2019).

#### 1.4.3.3 Le transcriptome

Le niveau d'expression de près de 200 gènes impliqués dans le métabolisme, le transport des nutriments et les réponses au stress ont été montrés comme étant régulés de façon positive ou négative par la plante (Xie et al., 2015). Ces modifications dans le transcriptome de *B. subtilis* sont responsables de changements fonctionnels, mais aussi morphologiques, au niveau de l'architecture des colonies. Par exemple le méthyl-salicylate, qui est un signal de défense libéré par la plante en réponse à une infection par un organisme pathogène, induit la formation de colonies mucoïdes chez *B. subtilis*. Ceci lui permet d'acquérir une protection contre les antimicrobiens en plus d'induire la production et sécrétion de bacilysine et de fengycine, deux antimicrobiens (Kobayashi, 2014). Ainsi, ces modifications pourraient avoir un apport important dans la défense de *B. subtilis* contre des agents pathogènes, mais aussi dans celle de la plante hôte.

#### 1.4.3.4 Les métabolites

Finalement, la plante influencerait la composition des métabolites secondaires produits par *B. subtilis* (Debois et al., 2015; Xie et al., 2015). À titre d'exemple, un lipopeptide agissant comme antimicrobien et surfactant, la surfactine, se retrouve produit et sécrété en plus grande quantité lorsqu'en présence de la plante (Debois et al., 2015). Cette augmentation de synthèse

est due à l'action des polysaccharides de paroi cellulaire de plantes et prend place dans les premiers stades de la colonisation des racines.

L'influence qu'a la plante sur les différents processus de *B. subtilis* montre l'étendue des échanges signalétiques qui peuvent avoir lieu entre les différents organismes dans la rhizosphère ainsi que la grande complexité des interactions. Dans le cas d'une relation avec un microorganisme considéré comme étant favorable, les signaux envoyés par la plante pourront apporter certains bénéfices favorisant de surcroît l'établissement d'une relation (Bais et al., 2006).

#### 1.4.4 LES MÉTABOLITES SECONDAIRES

Les métabolites secondaires sont de petites molécules non essentielles à la croissance de l'organisme, mais qui contribuent à sa valeur sélective et à son développement. La synthèse de ces molécules est généralement influencée par des pressions, biotiques ou abiotiques, présentes dans l'environnement (Harwood et al., 2018). *B. subtilis* possède une large gamme de métabolites secondaires desservant diverses fonctions. On retrouve des molécules impliquées dans la compétition, la défense contre d'autres organismes antagonistes, le transport de nutriments et de métaux, la symbiose, la régulation et la différenciation (Demain et Fang, 2000).

##### 1.4.4.1 Les antibiotiques

Comme pour l'ensemble des PGPR, ces métabolites sont particulièrement utiles à *B. subtilis* dans sa relation avec la plante puisque certains seront impliqués dans ses effets positifs sur la défense et la croissance de la plante (Kaspar et al., 2019). La majorité des molécules bioactives sécrétées par *B. subtilis* sont des antibiotiques (plus de 5% de son génome serait dédié à la synthèse de composés antimicrobiens), probablement en raison d'une évolution sous la pression de la variété d'organismes présents dans les environnements où se retrouve *B. subtilis*

(Stein, 2005). Par ailleurs, la synthèse de certaines classes de métabolites permet facilement des réarrangements aléatoires au sein de la structure chimique, permettant une adaptation relativement rapide à son environnement (Stein, 2005).

#### 1.4.4.2 Les types de métabolites secondaires

Les métabolites secondaires peuvent être classés selon deux catégories en fonction de leur mécanisme de synthèse. Les peptides synthétisés par voie ribosomale (RP) sont dérivés de courts précurseurs et sont transformés en composés matures par le biais de modifications post-traductionnelles et forment essentiellement des molécules antibiotiques ou impliquées dans certains signaux comme le *quorum sensing* (mécanismes de communication) et la compétence (Caulier et al., 2019). Les NRPS (*Non-ribosomal peptide synthetases*) et PKS (*Polyketide synthetase*) sont responsables de la production de peptides non-ribosomaux (NRP) dont des sidérophores, des surfactants et des antibiotiques (Harwood et al., 2018).

*B. subtilis* possède des opérons codant pour 3 principaux NRPS. L'opéron *dhbA-F* permet la biosynthèse du sidérophore bacillibactine, l'opéron *ppsA-E* est responsable de la synthèse du lipopeptide antimicrobien plipastatine, et l'opéron *srfAA-AD* permet de synthétiser la surfactine, un surfactant possédant des propriétés antibiotiques. Il possède de plus une NRPS/PKS encodée par *pksA-S* produisant la bacillaene, aussi un antibiotique (Cosmina et al., 1993; Ongena et Jacques, 2008; Straight et al., 2007; Tosato et al., 1997).

#### 1.4.4.3 L'implication de *sfp*

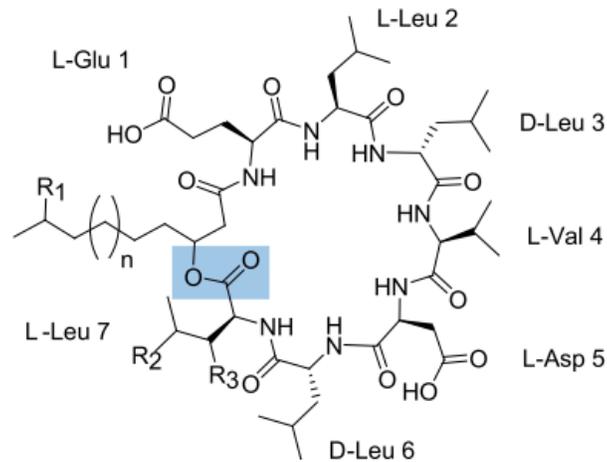
La synthèse de certains de ces métabolites, en plus de leur complexe enzymatique, nécessite la présence du gène *sfp*. Ce dernier code pour une 4'-Phosphopantetheinyl transférase connue comme étant impliquée dans la synthèse de surfactine (Sfp) (Quadri et al., 1998). Cet enzyme joue un rôle essentiel en tant que cofacteur de complexes enzymatiques pour les NRPS et les PKS (Mofid et al., 2004), et elle est donc aussi impliquée dans la synthèse de la bacillibactine, la plipastatine la bacillaene.

#### 1.4.5 LA SURFACTINE

Un métabolite secondaire particulièrement important produit par *B. subtilis* est la surfactine. Il s'agit d'un peptide synthétisé par voie non ribosomique (NRP) agissant comme un biosurfactant très puissant. La surfactine présente aussi des propriétés antibactériennes et antivirales, ainsi que plusieurs fonctions importantes pour le développement de la bactérie et sa survie dans son habitat naturel (Seydlová et Svobodová, 2008). La surfactine est une constituante importante dans les activités liées aux PGPR et plusieurs rôles physicochimiques et biologiques lui sont déjà connus.

##### 1.4.5.1 La structure

La surfactine est un petit (1036 Da) lipopeptide cyclique composé d'un heptapeptide formé des acides aminés L-Glu, L-Asp, L-Val et de deux résidus de L-Leu et de D-Leu liés par une chaîne d'acides gras bêta-hydroxy et cyclisés par un lien lactone (**Figure 10**) (Vollenbroich et al., 1994). La structure amphiphile (polaire et apolaire) du lipopeptide lui confère son pouvoir surfactant. La structure de la molécule peut cependant varier, principalement par la longueur de sa chaîne d'acides gras, entre C13 et C16, créant une variété d'isoformes (Jiang et al., 2016). Ces variations seraient affectées par les sources de carbone ainsi que les métaux présents dans l'environnement (Bartal et al., 2018).

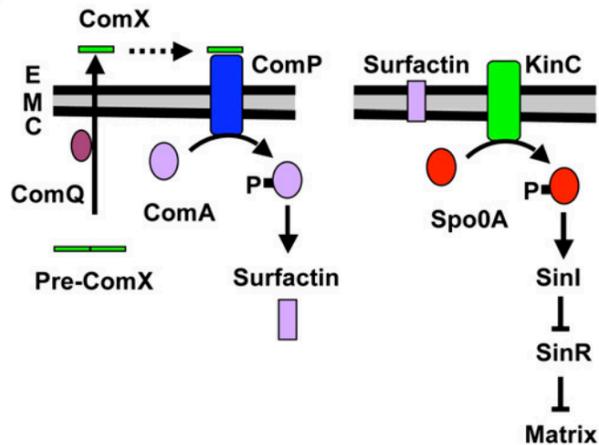


**Figure 10 Structure de la surfactine**

La surfactine est composée d'une chaîne de 7 acides aminés et d'un acide gras bêta-hydroxy. Le lien lactone est indiqué en bleu. Figure tirée de Kraas et al. (2010)

#### 1.4.5.2 Les voies de synthèse

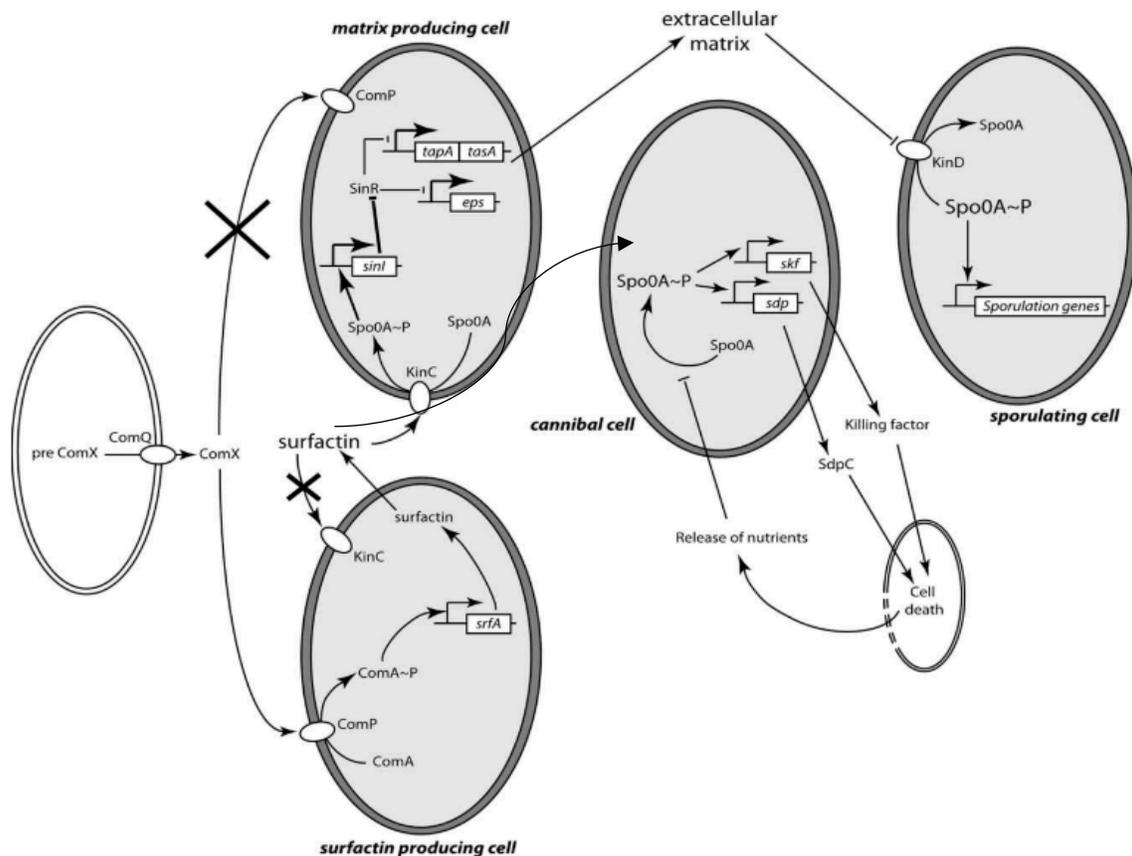
La production de la surfactine se fait en réponse à différents signaux endogènes et exogènes, notamment la densité cellulaire et le contact avec les racines de plantes. Le contrôle de l'activation des gènes de synthèses de la surfactine synthétase se fait par le système de communication intercellulaire (*quorum sensing*) ComQXPA, une voie de signalisation à deux composantes (**Figure 11**). Celui-ci est composé des protéines ComP, une histidine kinase, et de ComA, un régulateur de réponse, qui répondent au phéromone peptidique signal ComX (Oslizlo et al., 2014). Cette voie nécessite aussi la présence de l'isoprényle transférase ComQ qui modifie le peptide signal ComX entraînant sa sécrétion et son accumulation dans le milieu. La concentration de ComX est sentie par ComP ce qui permet la phosphorylation et l'activation de ComA. ComA-P déclenche une cascade qui permet la transcription des gènes de l'opéron *srfAA-D* permettant la synthèse de la surfactine. La transcription de cet opéron permet aussi d'acquérir une compétence naturelle via la transcription de *comS* (Mielich-Süss et Lopez, 2014).



**Figure 11 Voie de signalisation de la production de surfactine et son rôle dans la production de matrice**

(Gauche). L'induction de la production de surfactine se fait par la phéromone ComX via la voie ComQXPA  
 (Droite), La surfactine induit la synthèse de la matrice extracellulaire par l'entremise de Spo0A. Figure tirée de López et al. (2009a)

Dans le cadre de la formation de biofilm, ComX et la surfactine sont des signaux importants pour l'organisation de sous-populations selon des fonctions spécifiques. Cette signalisation est unidirectionnelle permettant de conserver les deux types cellulaires différenciés au sein de la population : les productrices de surfactine et les productrices de matrice extracellulaire. ComX induit la production de surfactine qui induit la production de matrice chez les cellules productrices de matrice (López et al., 2009b). Les cellules productrices de surfactine ne sont pas influencées par le lipopeptide, tout comme les cellules produisant la matrice sous l'influence de la surfactine ne répondent plus à ComX, maintenant l'hétérogénéité au sein du biofilm (**Figure 12**) (López et al., 2009a).



**Figure 12** Aperçu des signaux et voies de contrôle médiant l'hétérogénéité de fonctions cellulaires au sein du biofilm

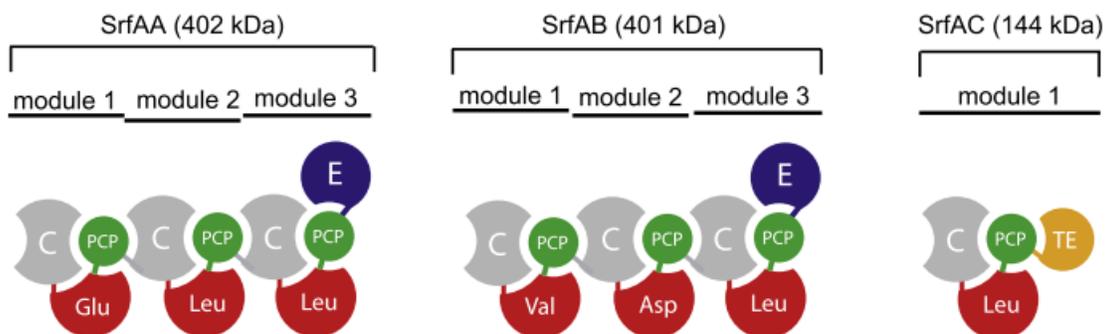
ComX et la surfactine sont impliquées dans la signalisation menant à la production exclusive de surfactine ou de matrice extracellulaire. L'activation des voies de synthèse de matrice inhibe les voies de sporulation. La surfactine est aussi impliquée dans le cannibalisme d'une sous-population de cellules. Figure modifiée de Dubnau et Mirouze (2013)

### 1.4.5.3 La biosynthèse

Comme il s'agit d'un NRP, la production de surfactine par *B. subtilis* passe par la synthèse d'un complexe multienzymatique NRPS, la surfactine synthétase, composé de 4 sous-unités : SrfAA, SrfAB, SrfAC et SrfAD. L'opéron *srfAA-AD* code pour l'ensemble des gènes (Vollenbroich et al., 1994), mais la synthèse peut être complétée par un complexe formé par les 3 premières sous-unités, SrfAA, SrfAB et SrfAC, qui sont des peptide synthétases (Kraas et al., 2010).

Ces enzymes comprennent plusieurs domaines, soit des domaines de condensation permettant les liaisons peptidiques, des domaines d'adénylation permettant la fixation et l'activation de chaque acide aminé spécifique, et des acyltransférases permettant l'initiation de l'élongation. On retrouve aussi un domaine d'épimérisation sur SrfAA et SrfAB, permettant de modifier la configuration des isomères d'acides aminés, dans ce cas-ci la leucine. Finalement, SrfAC comporte une thioestérase en C-terminal permettant l'élongation, la cyclisation ainsi que l'arrêt de la production libérant la chaîne lipopeptidique (**Figure 13**) (Kraas et al., 2010; Seydlová et Svobodová, 2008).

Plus précisément, la biosynthèse débute par l'acylation du premier acide aminé (L-Glu) par SrfAA et les 2 suivants (L-Leu) par SrfAB-AC. Le domaine d'épimérisation permet la formation du D-Leu. SrfAB synthétise les L-Val, L-Asp et D-Leu suivant et SrfAC la L-Leu, permettant la cyclisation et complétant la biosynthèse (Kraas et al., 2010; Steller et al., 2004).



**Figure 13 Assemblage de la surfactine**

Les sous-unités SrfAA et SrfAB comprennent 3 modules et SrfAC en comprend 1. Chaque module comprend un domaine de condensation (en gris), un domaine d'adénylation (en rouge) et une protéine porteuse d'acyle (en vert). SrfAA et SrfAB comprennent aussi chacune un domaine d'épimérisation (en bleu) alors que SrfAC possède un domaine thioestérase (en jaune). Figure tirée de Kraas et al. (2010)

SrfAD n'est pas essentielle à la biosynthèse de la surfactine, mais elle joue un rôle important dans l'efficacité de la réaction puisqu'elle stimule la formation de produits d'initiation (Steller

et al., 2004). SrfAD possède un domaine thioestérase, tout comme SrfAC, mais ceux-ci n'ont pas la même fonction. Alors que SrfAC est impliqué dans la terminaison de la synthèse, SrfAD joue un rôle au niveau de l'initiation en liant et transférant l'acide gras  $\beta$ -hydroxy au domaine d'adénylation Glu de SrfAA (Steller et al., 2004; Vollenbroich et al., 1994). Par ailleurs, sa portion thioestérase lui confère une fonction de réparation par l'élimination des acides aminés chargés incorrectement à la protéine porteuse d'acyle en N-terminal pendant l'assemblage ce qui permet une optimisation de la biosynthèse et augmente la production de surfactine (Schwarzer et al., 2002; Steller et al., 2004).

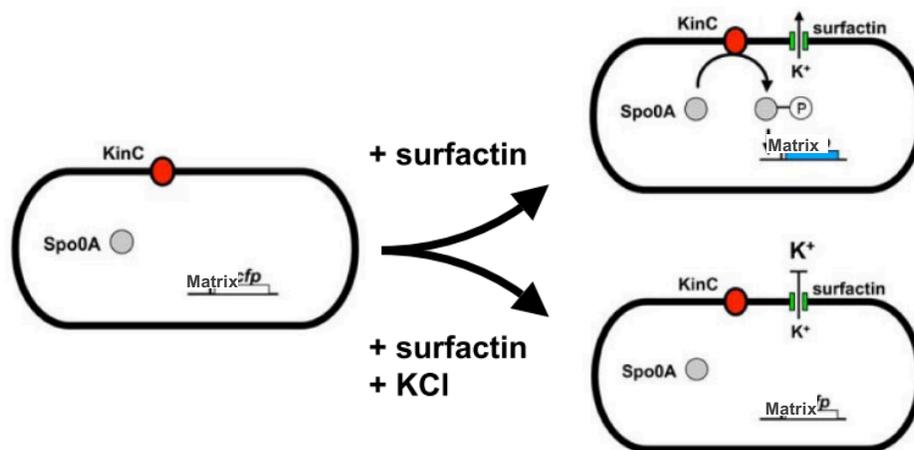
#### 1.4.5.4 Les fonctions de la surfactine

**Surfactant** - La surfactine tient son nom de ses capacités de surfactant. Il s'agit en effet d'un des biosurfactants les plus puissants qui, en raison de sa structure, peut abaisser la tension superficielle de l'eau de 72 à 27 mN/m. Cette propriété est notamment impliquée dans la motilité de la bactérie. En plus des flagelles, un déplacement multicellulaire sur une surface solide (*swarming*) serait dépendant de la surfactine ce qui permettrait, entre autres, de se déplacer très efficacement vers des niches riches en nutriments (Calvio et al., 2005; Harshey, 2003; Kearns et Losick, 2003). De plus, la présence de la molécule serait aussi nécessaire au mécanisme de déplacement par glissement indépendant des flagelles (*sliding*) (Kinsinger et al., 2003). Elle permet l'étalement de la colonie bactérienne par un gradient de tension de surface qui déplace les bactéries vers l'extérieur de la colonie sans la présence de flagelles (Angelini et al., 2009).

**Antimicrobien** - Une deuxième fonction attribuée à la surfactine est son activité antimicrobienne, notamment à titre d'antiviral, d'antimycoplasme, d'antifongique et d'antibactérien à large spectre (Cawoy et al., 2015; Fan et al., 2017; Zeridouh et al., 2011). Cette molécule bipolaire peut interférer avec l'intégrité de la membrane des cellules cibles entraînant une perméabilisation de celles-ci (Carrillo et al., 2003; Deleu et al., 2003) (Yuan et al., 2018). De plus, elle permet la désintégration de l'enveloppe virale par l'inhibition de la

fusion. Il est à noter que le type d'effet qu'aura la molécule sur les différents organismes dépend du variant de surfactine, c'est-à-dire de la longueur de la chaîne carbonique (Ongena et Jacques, 2008).

**Implication dans la formation du biofilm** - La surfactine serait aussi indirectement impliquée dans la formation de biofilm à titre de molécule signal (López et al., 2009a; Zerriouh et al., 2014). Le lipopeptide est en mesure de s'insérer dans la membrane cytoplasmique de *B. subtilis*, formant des pores à la surface de la cellule. Les pores ainsi créés permettent un flux de cations. Plus particulièrement, la fuite d'ions potassium est sentie par une protéine kinase membranaire, KinC, une des kinases contrôlant le niveau de phosphorylation du régulateur principal de différenciation cellulaire, Spo0A (**Figure 14**). L'activation de KinC entraîne une cascade de signalisation menant à la transcription des gènes impliqués dans la formation de matrice extracellulaire, les opérons *epsA-O* et *tasA-sipW-tapA* (López et al., 2009b). Ainsi, la surfactine possède un rôle important dans la détermination du destin cellulaire. Par ailleurs, certaines études indiquent que la surfactine serait indispensable à la formation d'un biofilm robuste et stable ainsi qu'à la colonisation des racines (Bais et al., 2004b; Oslizlo et al., 2015). Cette observation semblerait cependant dépendante de la souche étudiée (Oslizlo et al., 2015).



#### **Figure 14 Mécanisme d'action de la surfactine induisant la production de matrice extracellulaire**

La surfactine crée un pore dans la membrane entraînant un efflux de  $K^+$  ressenti par la kinase KinC qui phosphoryle le régulateur Spo0A. Spo0A-P permet la transcription des gènes relatifs à la matrice extracellulaire. L'ajout de KCl masque l'effet de la surfactine. Il n'y a donc pas d'activation de la cascade de signalisation. Figure modifiée de López et al. (2009b)

**Implication dans la résistance au stress** - Lors du développement de la colonie, le cannibalisme est un mécanisme utilisé pour retarder la sporulation. En effet, le vieillissement du biofilm entraîne un stress par manque de nutriments. Lorsque les gènes de cannibalisme *sdp* et *skf* sont traduits, les toxines Skf et Sdp sont produites et entraînent la lyse d'une partie de la population, permettant la libération d'une quantité de nutriments qui servent à la survie des cellules productrices de matrice. Cette expression des gènes encodant pour les toxines de cannibalisme est induite par la surfactine au même moment que la formation du biofilm. Cet événement permet donc la poursuite du développement du biofilm (**Figure 12**) (González-Pastor, 2011; González-Pastor et al., 2003; López et al., 2009c). De surcroît, la surfactine sécrétée et les toxines de cannibalisme sont responsables des activités de biocontrôle lors d'interactions avec d'autres espèces bactériennes (Rosenberg et al., 2016).

Finalement, par le même mécanisme de dépolarisation cellulaire, la surfactine permet à une sous-population de faire face au stress de déplétion en oxygène pouvant survenir, particulièrement au sein du biofilm. En effet, dans un milieu peu alimenté en oxygène, il peut survenir la mort d'une grande partie de la population. La dépolarisation induite par la surfactine permettrait de réduire la consommation d'oxygène et donc la viabilité d'une portion des cellules (Arjes et al., 2020).

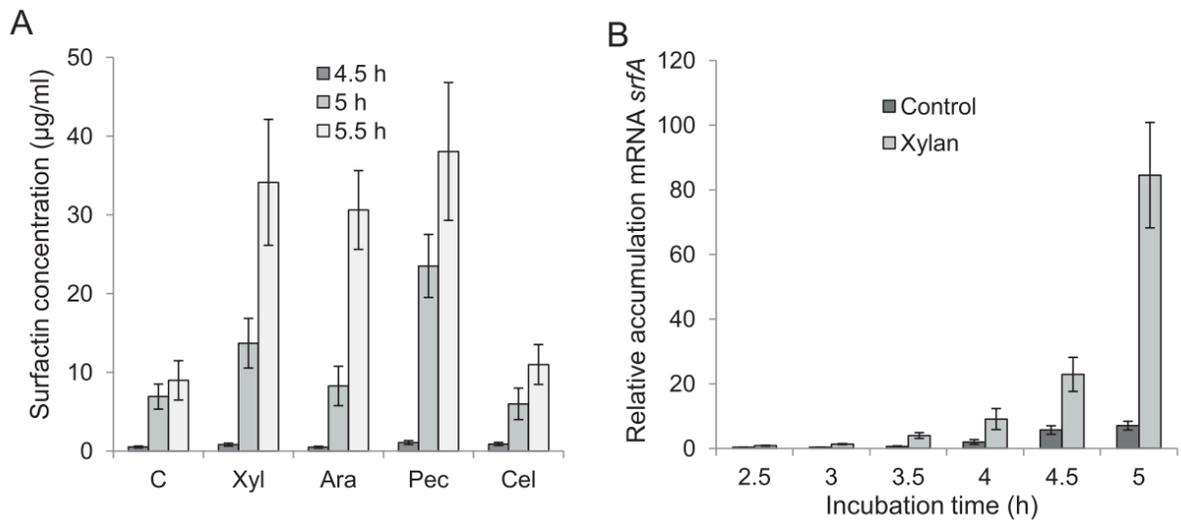
**Implication dans la relation avec la plante** - La surfactine est une constituante importante dans les activités liées aux PGPR. En plus de participer à l'induction de la production de matrice extracellulaire (López et al., 2009b; Zerouh et al., 2014), ce lipopeptide contribue à la défense

de la plante, notamment par ses propriétés antimicrobiennes (Bais et al., 2004b; Fan et al., 2017).

Par ailleurs, la surfactine sécrétée dans l'environnement est sentie par la plante comme signal et élicite la résistance systémique induite (ISR) initiant les mécanismes de défense (Ongena et al., 2007). La réaction à ce MAMP (*Microbe-associated molecular pattern*) est considérablement atténuée en comparaison à la réaction de défense face à un PAMP (*Pathogen-associated molecular pattern*). En effet, la présence du motif d'acides aminés flg22 (PAMP) entraîne une forte production de ROS, indicatif de l'induction de la résistance, alors que la surfactine (MAMP) produit une réaction de faible amplitude. Ce phénomène permet de limiter le stress sur la plante, ainsi que de permettre à *B. subtilis* d'être tolérée et de croître dans le milieu, tout en préparant la plante contre des infections potentielles (Debois et al., 2015).

#### 1.4.5.5 L'influence de la plante sur la production de surfactine

Une grande quantité de surfactine est produite par *B. subtilis* dans les stades précoces de la colonisation des racines (Debois et al., 2014, 2015; Pessotti et al., 2019). De plus, chez *Bacillus amyloliquefaciens*, ce lipopeptide est la seule composante antibiotique produite suite au contact avec les tissus racinaires. Il a été observé que cette synthèse et accumulation rapide est stimulée par la présence de polysaccharides de la paroi cellulaire racinaire, tels que la pectine, le xylane et l'arabinogalactane, ce qui suggère fortement l'influence de la plante (**Figure 15**). Cette influence donne lieu à une accumulation d'ARNm de *srfA* (Debois et al., 2015). Cette observation rappelle l'implication de ces polysaccharides dans l'induction de la formation de matrice extracellulaire chez *B. subtilis* (Beauregard et al., 2013).



**Figure 15** La synthèse de la surfactine chez *B. amyloliquefaciens* est augmentée lors de la perception des polysaccharides de la paroi cellulaire.

(A) Production de surfactine en fonction du temps par des cellules cultivées dans du LB complétement ou non d'arabinogalactane (Ara), de xylane (Xyl), de pectine (Pec) et de carboxyméthylcellulose (Cel) à 0,1%. (B) Expression différentielle de *srfA* analysée par qRT-PCR par des cellules cultivées dans du LB complétement ou non de xylane à 0,1%. Figure tirée de Debois et al. (2015)

## 1.5 HYPOTHÈSES ET OBJECTIFS DU PROJET DE RECHERCHE

Plusieurs études mentionnent les multiples rôles de la surfactine et ses effets sur le développement de *B. subtilis* autant sur le plan individuel que sur la communauté. Plus particulièrement, ce lipopeptide serait d'une grande importance lors du développement d'une relation étroite avec la plante, au niveau de la rhizosphère. Comme la plante influence son environnement, il ne serait pas étonnant qu'elle ait un effet sur la production de surfactine, un élément important au sein de l'établissement de cette relation.

Les observations actuelles font état de l'influence positive de la plante sur la synthèse de surfactine chez *Bacillus amyloliquefaciens* selon un mécanisme toutefois inconnu (Debois et al., 2015). La surfactine ainsi produite permet en échange d'induire une défense immunitaire atténuée chez la plante. Ces interactions sont un exemple important d'échange de signaux impliqués dans la relation avec la plante. Il serait nécessaire de confirmer ce mécanisme dans d'autres espèces modèles du genre *Bacillus*, notamment *B. subtilis*. Par ailleurs, le mécanisme d'action sous-tendant doit être investigué afin de permettre de comprendre à quel niveau a lieu cette induction lors du contact avec les racines et par quelle voie de contrôle.

Par cette étude, nous souhaitons vérifier l'effet qu'ont les polysaccharides végétaux sur la production de surfactine chez *B. subtilis* tel qu'il a été observé chez *B. amyloliquefaciens*. En raison de la proximité phylogénétique des deux espèces ainsi que des rôles déjà connus à la surfactine dans la relation avec la plante, nous posons l'hypothèse que les polysaccharides végétaux induiront la production de surfactine chez *B. subtilis*.

Concernant l'implication de la surfactine dans l'établissement de la colonisation des racines et de la formation de biofilm, on retrouve plusieurs mentions discordantes dans la littérature. En laboratoire dans un milieu riche, la surfactine permet d'activer un des processus de *quorum sensing* menant à la formation de biofilm (López et al., 2009b). Certaines études montrent des

défectuosités modérées à sévères sur la formation du biofilm lors de l'inactivation du gène *urfAA* (Oslizlo et al., 2015). La surfactine pourrait être essentielle à la formation du biofilm et même à la colonisation sur la plante (Bais et al., 2004b). Bien que certaines de ces observations aient été réalisées sur des espèces étroitement liées, mais distinctes, ou dans des conditions différentes, certaines contradictions demeurent incomprises. Parmi celles-ci, on retrouve des incohérences au niveau des souches délétées pour la synthèse de surfactine. En effet, certaines constructions de mutants *urfAA* ont été développées de manières distinctes et montrent des phénotypes différents. De plus, certaines études se penchant sur les effets d'une délétion de surfactine utilisent une souche dans laquelle le gène *urf* a été muté. Or, selon ce qui est connu sur la protéine *Urf*, cette délétion entraîne aussi des effets sur la synthèse d'autres NRPS en plus de la surfactine.

Afin de mieux comprendre les différences observées dans la littérature ainsi que les conditions y étant associées, cette étude a aussi comme objectif de valider l'implication de la surfactine dans la formation de biofilm selon les trois principaux modèles d'études, soit, le biofilm en colonie sur milieux solide, la pellicule en milieu liquide et le développement d'un biofilm sur les racines de plante. Étant donné que des anomalies ont été relevées chez certaines souches utilisées dans des études précédentes, l'hypothèse de départ est que le rôle de la surfactine pourrait être moins important que ce qui est rapporté jusqu'à maintenant.

Dans son ensemble, cette étude cherche à éclaircir les informations actuelles concernant les liens entre la surfactine de *B. subtilis* et la plante, particulièrement dans le cadre de la colonisation et formation de biofilm sur les racines, mais aussi dans l'influence de la plante sur sa production.

## CHAPITRE 2

### L'IMPLICATION DE LA PLANTE DANS LA PRODUCTION DE SURFACTINE CHEZ *BACILLUS SUBTILIS*

L'objectif de cette étude fût tout d'abord d'observer la réponse de *B. subtilis*, en termes de production de surfactine, lorsque celle-ci se trouve sous l'influence de la plante par l'entremise de polysaccharides racinaires. Un rapporteur de l'activité transcriptionnelle du promoteur du gène *surfAA* ( $P_{surfAA}$ ) a été utilisé afin de tenter de répondre à l'hypothèse selon laquelle la présence de la plante influe positivement la production de surfactine. Cette même méthode a aussi permis d'étudier le type de contrôle cellulaire impliqué, i.e. s'il s'agit ou non d'un contrôle de type transcriptionnel, par la quantification de l'activation de  $P_{surfAA}$  en réponse à différents polysaccharides de la plante. L'implication de la principale voie de signalisation contrôlant la production de surfactine, celle de ComQXPA, a ensuite été étudiée afin d'approfondir la compréhension de ce système.

#### 2.1 MATÉRIEL ET MÉTHODOLOGIE

##### 2.1.1 Souches et milieux de culture

Les souches utilisées dans cette étude sont répertoriées dans le **Tableau 1**. *Bacillus subtilis* NCIB 3610 a été utilisée comme souche sauvage et a fourni la base génétique pour les autres souches. Les souches ont été réalisées par transduction des constructions par des phages SPP1 (Yasbin et Young, 1974). Les cultures de routine ont été faites dans le milieu LB (*lysogeny broth*) Lenox liquide ou gélosé avec 1,5% d'agar : 10 g/L de peptone, 5 g/L d'extrait de levures, 5 g/L de NaCl. Pour les essais de formation de biofilm, les milieux utilisés sont le MSNc (milieu minimal n'induisant pas la formation de biofilm), MSNc + pectine ou MSNc + xylane : 5 mM tampon phosphate de potassium à pH 7 ; 0,1 M tampon MOPS à pH7 ; 2 mM  $MgCl_2$  ; 0,05 mM

MnCl<sub>2</sub> ; 1 μM ZnCl<sub>2</sub> ; 2 μM thiamine ; 700 μM CaCl<sub>2</sub> ; 0,2% NH<sub>4</sub>Cl ; 0,5% de cellobiose avec ou sans 0,5% de pectine (Sigma CAS 76282) ou de xylane (Apollo BI3856), ainsi que le MSgg (milieu minimal induisant le biofilm) : 5 mM phosphate de potassium à pH 7 ; 100 mM de tampon MOPS à pH 7 ; 2 mM MgCl<sub>2</sub>, 700 μM CaCl<sub>2</sub> ; 50 μM MnCl<sub>2</sub> ; 50 μM FeCl<sub>3</sub> ; 1 μM ZnCl<sub>2</sub> ; 2 μM thiamine ; 0,5% de glycérol ; 0,5% de glutamate ; 50 μg/ml de tryptophane ; 50 μg/ml de phénylalanine. Le tampon Z a été utilisé lors des essais bêta-galactosidase : 40 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> ; 60 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> ; 1 mM MgSO<sub>4</sub> ; 10 mM KCl. Pour l'essai de qRT-PCR, du PBS a été utilisé : 137 mM NaCl ; 2,7 mM KCl ; 10 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> ; 4,2mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>.

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

Souches	Génotypes	Références
NCIB 3610	WT / Non domestiquée	Inventaire du laboratoire
MT335	3610 <i>amyE::P<sub>srfAA</sub>-lacZ</i> (Chl <sup>R</sup> )	(López et al., 2009a)
PB174	3610 <i>amyE::P<sub>tapA</sub>-lacZ</i> (Spec <sup>R</sup> )	Inventaire du laboratoire
MT476	3610 <i>srfAA::kan</i>	Cette étude
MT619	3610 <i>srfAA::kan amyE::P<sub>tapA</sub>-lacZ</i> (Spec <sup>R</sup> )	MT476 dans PB174
PB301	3610 <i>comA::cat</i>	Inventaire du laboratoire
MT618	3610 <i>comA::cat amyE::P<sub>tapA</sub>-lacZ</i> (Spec <sup>R</sup> )	PB301 dans MT335

### 2.1.2 Conditions de culture et formation de biofilm

Les souches ont été striées sur un milieu LB agar et incubées pour la nuit à 37 °C. Une colonie a été prélevée et inoculée dans 3 mL de bouillon LB. La suspension a été incubée 3 h à 37 °C avec rotation. L'échantillon a été ajusté à une DO<sub>600</sub> de 1. Une goutte de 2 μL a été déposée sur une gélose du milieu approprié et incubée à 30 °C jusqu'à l'analyse.

### 2.1.3 Essais bêta-galactosidase

Les colonies ont été collectées et suspendues dans 1 mL de tampon Z. La suspension a été soniquée pendant 10 s par intervalles de 1 s à 30% de puissance afin de défaire le biofilm. La  $DO_{600nm}$ , représentant la densité cellulaire, a été mesurée. Un volume de 2,65  $\mu$ L de 2-mercaptoéthanol a été ajouté à chaque échantillon, suivi de 10  $\mu$ L d'une solution de 0,2 mg/mL de lysozyme dans du tampon Z, avant de les incuber 30 min à 30 °C. Les échantillons ont par la suite été dilués dans du tampon Z dans une plaque 48-puits pour un volume total de 500  $\mu$ L par échantillon. 100  $\mu$ L d'une solution de tampon Z 38 mM 2-mercaptoéthanol contenant 4 mg d'ONPG ont été ajoutés pour démarrer la réaction. Au moment du développement de couleur jaune, 250  $\mu$ L de  $Na_2CO_3$  ont été ajoutés pour arrêter la réaction et la durée de la réaction a été notée. La  $DO_{420nm}$ , mesurant la quantité d'o-nitrophénol, et la  $DO_{550nm}$ , permettant de corriger la diffusion de la lumière, ont été mesurées et la valeur d'unités de Miller a été calculée selon l'Équation 2-1.

**Équation 2-1** Calcul de la valeur d'unités de Miller ( $A_{420nm}/min/mL$  de cellules/ $DO_{600nm}$ )

$$1000 \times \frac{DO_{420nm} - 1,75 \times DO_{550nm}}{T(\text{min}) \times V(\text{mL}) \times DO_{600nm}}$$

## 2.2 RÉSULTATS ET DISCUSSION

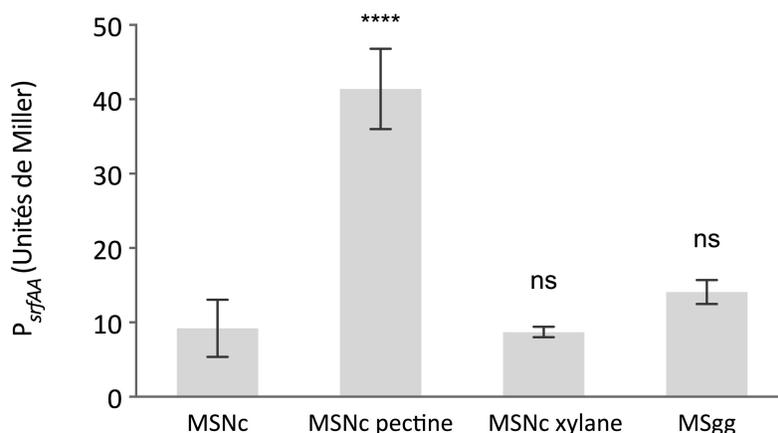
### 2.2.1 Un contrôle transcriptionnel régule la synthèse de surfactine en réponse aux polysaccharides de paroi cellulaire végétale

Les polysaccharides sécrétés ou présents à la surface des cellules végétales jouent un rôle essentiel en tant que signaux aux organismes environnants. Ceux-ci sont d'ailleurs connus pour induire la production de biofilm chez *B. subtilis*, contribuant à la colonisation des racines par la bactérie (Beauregard et al., 2013). D'autre part, la bactérie sécrète la surfactine, une

composante particulièrement importante dans cette relation pour son rôle dans la motilité, la formation de biofilm et le biocontrôle. Précédemment, chez *B. amyloliquefaciens*, un lien a été établi entre les polysaccharides de la paroi cellulaire végétale et la synthèse de surfactine (Debois et al., 2015). Considérant que cette observation pourrait aussi être applicable à *B. subtilis*, l'activité transcriptionnelle du promoteur du gène *srfAA* lors de la formation de biofilm en réponse aux polysaccharides de plante a été étudiée.

Pour une quantification de l'activation du promoteur du gène *srfAA*, codant pour la première sous-unité de la surfactine synthase, celui-ci a été couplé au gène *lacZ* de la bêta-galactosidase. Le reporteur  $P_{srfAA}$ -*lacZ* a été utilisé dans un essai enzymatique bêta-galactosidase et a donc permis de vérifier l'activité du promoteur en réponse à différent milieu à différents points dans le temps (14, 16, 18 et 20 h) qui sont représentatifs de l'apparition du biofilm de *B. subtilis* en milieu solide. Le MSgg, induisant la production de matrice, a été utilisé comme contrôle positif. Le MSNc, n'induisant pas le processus, a été utilisé à des fins de comparaison avec les milieux MSNc supplémentés avec de la pectine et du xylane, deux polysaccharides présents en grandes quantités dans les tissus racinaires et connus comme induisant la production de matrice. Les résultats de cet essai démontrent une augmentation de l'induction du promoteur du gène *srfAA* lorsque la formation de biofilm est induite en présence de pectine, suggérant d'une part que, comme chez *B. amyloliquefaciens* (Debois et al., 2015), la pectine pourrait induire la biosynthèse de surfactine chez *B. subtilis* et que le contrôle de cette synthèse se fait de façon transcriptionnelle (**Figure 16**) La quantification de cette induction en unités de Miller est environ 4 fois plus élevée que lors de la formation de biofilm en MSgg. Selon les résultats observés, l'activation de  $P_{srfAA}$  serait plus marquée à 20h mais est remarquable lors des premiers points étudiés (non montrés). À l'inverse, l'activité du promoteur reste inchangée en présence de xylane malgré la formation de biofilm, signifiant que le xylane n'active pas la transcription de *srfAA*, du moins aux différents points dans le temps ayant été étudiés. Cela pourrait suggérer l'existence de mécanismes propres aux différents polysaccharides de plantes ou alors une influence du xylane plus tôt dans la formation du biofilm. De façon intéressante,

lors de la colonisation de racines, dès 4h suivant l'inoculation, la population bactérienne est majoritairement composée de cellules exprimant les gènes de formation de matrice (Allard-Massicotte et al., 2016). Il serait ainsi possible que la synthèse de surfactine soit induite dans ce stade précoce de l'établissement du biofilm en présence de xylane.



**Figure 16** Expression de  $P_{srfAA}$  lors de la formation de biofilm en réponse à différentes sources de carbone

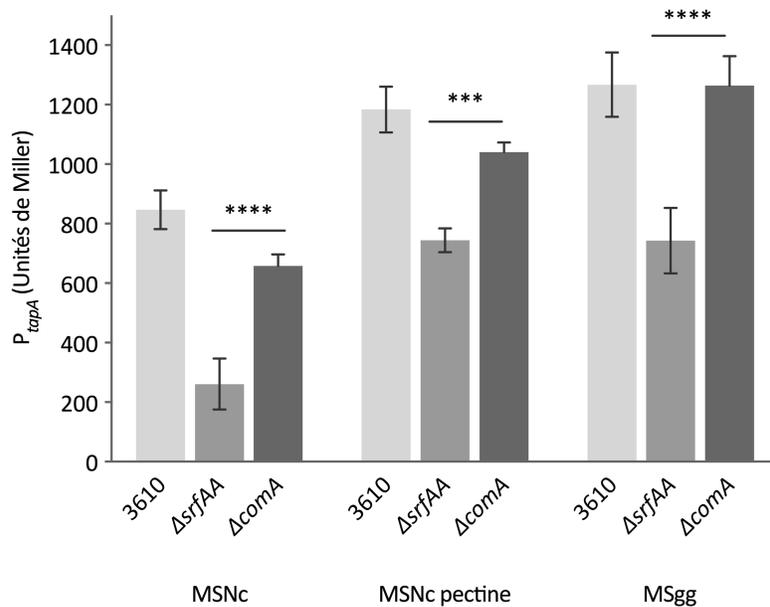
Essai enzymatique avec *B. subtilis* NCIB 3610  $P_{srfAA}$ -*lacZ* en MSNc, MSNc + 0,5% pectine ou xylane et MSgg gélosé à 20h suite à l'inoculation. Les unités de Miller sont exprimées en  $A_{420}/\text{min}/\text{mL}$  de cellules/ $DO_{600}$ . Les expériences sont représentatives d'au moins trois répétitions biologiques indépendantes. Les barres représentent la moyenne et l'écart type des répétitions biologiques. La signification statistique a été évaluée à l'aide d'un test ANOVA à un facteur avec le logiciel GraphPad PRISM 7 (\*\*\*\* =  $P < 0,0001$ , ns = non significatif).

### 2.2.2 La synthèse de surfactine en réponse à la pectine est indépendante du système ComQXPA

Afin de comprendre le processus par lequel la pectine induit l'activation de  $P_{srfAA}$ , l'implication de la voie ComQXP, une des principales voies de synthèse de la surfactine, a été vérifiée. Un des régulateurs principaux de cette voie de signalisation est ComA qui module l'activation de la transcription. Une méthode efficace de vérifier l'implication de ce régulateur de transcription serait d'insérer un rapporteur pour l'expression du promoteur de *srfAA* dans un mutant délété pour *comA*. Cependant, les souches NCIB 3610  $amyE::P_{srfAA}$ -*lacZ* ( $ChI^R$ ) et NCIB

3610 *comA::cat* portant toutes deux un gène de résistance au chloramphénicol comme marqueur de sélection, cette construction n'était pas réalisable à court terme. Afin de préliminairement vérifier cette hypothèse, une alternative a dû être utilisée. L'implication de *comA* a donc été étudiée par l'analyse de l'expression de  $P_{tapA}$  chez un mutant  $\Delta comA$  dans un milieu contenant de la pectine (MSNc pectine). Précédemment, il a été démontré que l'absence de surfactine lors de la formation de biofilm sur milieu solide influençait l'activation de  $P_{tapA}$ , responsable de la production de fibre amyloïde faisant partie de la composition de la matrice (**Figure 16**). Étant donné l'implication de la surfactine dans la production de biofilm en milieu solide, l'hypothèse est que, si la production de surfactine en présence de pectine est dépendante du système ComQXPA, un mutant délété pour *comA* montrerait un défaut de production de biofilm similaire à celui d'un mutant déficient pour la surfactine.

Un essai bêta-galactosidase avec le reporteur  $P_{tapA-lacZ}$  introduit dans un mutant  $\Delta comA$  a donc été réalisé. Cet essai tend à démontrer que l'absence de ComA n'a pas un effet aussi important sur la production de matrice extracellulaire en présence de pectine qu'un mutant déficient pour la surfactine (**Figure 17**). Cela laisse ainsi croire que la synthèse de surfactine en présence de pectine, tout comme en MSgg, serait régulée, en partie ou en totalité, par l'entremise d'une autre voie que celle de ComA mais le mécanisme sous-tendant cette observation reste inconnu.



**Figure 17 Expression de  $P_{tapA}$  lors de la formation de biofilm**

Essai enzymatique avec *B. subtilis* NCIB 3610  $P_{tapA}$ -*lacZ* en MSNc, MSNc + 0,5% pectine et MSgg gélosé à 20 h suite à l'inoculation. Les unités de Miller sont exprimées en  $A_{420}/\text{min}/\text{mL}$  de cellules/ $DO_{600}$ . Les valeurs représentent la moyenne de six répliquas techniques. Les expériences sont représentatives d'au moins trois répétitions biologiques indépendantes. Les barres représentent la moyenne et l'écart type des répétitions biologiques. La signification statistique a été évaluée à l'aide du test ANOVA à deux facteurs suivi d'une comparaison multiple par un test de Dunnett (\*\*\*) =  $P < 0,001$ , \*\*\*\* =  $P < 0,0001$ ). Seules les analyses entre les deux mutants sont illustrées sur cette figure. Les analyses statistiques ont été réalisées avec le logiciel GraphPad PRISM 7.



## CHAPITRE 3

### L'IMPLICATION DE LA SURFACTINE DANS LA FORMATION DE BIOFILM CHEZ

#### *BACILLUS SUBTILIS* - PUBLICATION SCIENTIFIQUE

#### 3.1 PRÉSENTATION DE LA PUBLICATION

TITRE:

Surfactin production is not essential for pellicle and root-associated biofilm development of *Bacillus subtilis*

AUTEURS:

Maude Thérien<sup>1,#</sup>, Heiko T. Kiesevalter<sup>2,#</sup>, Emile Auria<sup>1,3</sup>, Vincent Charron-Lamoureux<sup>1</sup>, Mario Wibowo<sup>4</sup>, Gergely Maróti<sup>5</sup>, Ákos T. Kovács<sup>2,\*</sup>, Pascale B. Beauregard<sup>1,\*</sup>

<sup>1</sup> Centre SÈVE, Département de biologie, Faculté des Sciences, Université de Sherbrooke, Sherbrooke, Canada

<sup>2</sup> Bacterial Interactions and Evolution Group, DTU Bioengineering, Technical University of Denmark, Kgs Lyngby, Denmark

<sup>3</sup> Biology department, École Normale Supérieure Paris-Saclay, Paris-Saclay University, Cachan, France

<sup>4</sup> Natural Product Discovery Group, DTU Bioengineering, Technical University of Denmark, Kgs Lyngby, Denmark

<sup>5</sup> Institute of Plant Biology, Biological Research Center of the Hungarian Academy of Sciences, Szeged, Hungary

# Co-premiers auteurs

\* Auteurs de correspondance

### 3.1.1 RÉSUMÉ

Les métabolites secondaires ont un impact important sur le potentiel de lutte biologique contre les pathogènes dérivés du sol. De plus, il a été suggéré que diverses molécules chimiques produites par des microorganismes ont un impact sur le développement et la différenciation phénotypique des bactéries, y compris les biofilms. Le lipopeptide synthétisé de façon non ribosomal de *Bacillus subtilis*, la surfactine, a été décrit comme ayant un impact sur la capacité de promotion de la croissance des plantes de cette bactérie. Ici, nous avons étudié l'impact de la production de surfactine sur la formation de biofilm de *B. subtilis* en utilisant les systèmes de modèle de laboratoire ; formation de pellicules à l'interface air-milieu et développement de colonies complexes sur le plan architectural, en plus des biofilms associés aux racines des plantes. Nous avons constaté que la production de surfactine par *B. subtilis* n'est pas essentielle à la formation de biofilm pelliculaire ni dans la souche bien étudiée, NCIB 3610, ni dans les souches environnementales nouvellement isolées, mais le manque de surfactine réduit l'expansion des colonies. De plus, la colonisation des racines de plantes est comparable en présence ou en l'absence de synthèse de surfactine. Nos résultats suggèrent que les effets bénéfiques aux plantes liés à la surfactine chez les souches de *B. subtilis* sont indépendants de la formation du biofilm.

### 3.1.2 ORIGINALITÉ DU TRAVAIL

Ce travail indique pour la première fois que la production de surfactine par *B. subtilis* n'est pas essentielle à la formation de biofilm, contrairement à ce qui est mentionné dans la littérature. Il confirme aussi que la protéine Sfp, impliquée dans la synthèse de surfactine, est impliquée dans la synthèse d'autres NRPS, ce qui nous permet de conclure que le mutant  $\Delta sfp$  n'équivaut pas au mutant  $\Delta srf$  dans des études portant sur les rôles de la surfactine.

### 3.1.3 CONTRIBUTION DES AUTEURS

Maude Thérien: Conceptualisation, Investigation, Méthodologie : colonisation des racines, formation de biofilm en milieu liquide (pellicule) et solide, microscopie à fluorescence, quantification des cellules formant du biofilm sur les racines, Écriture : révision et édition

Heiko T. Kiewewalter: Investigation, Méthodologie : colonisation des racines, formation de pellicule, microscopie confocale, UHPLC-HRMS, ESI-MS, Écriture : révision et édition

Emile Auria: Investigation, Validation

Vincent Charron-Lamoureux: Investigation, Écriture : révision et édition, Visualisation

Mario Wibowo: Investigation, Écriture : révision et édition

Gergely Maróti: Méthodologie : séquençage, Ressources, Écriture : révision et édition

Ákos T. Kovács: Conceptualisation, Écriture : écriture initiale, révision et édition, Supervision, Acquisition du financement

Pascale B. Beauregard: Conceptualisation, Écriture : écriture initiale, révision et édition, Supervision, Acquisition du financement

### 3.1.4 RÉFÉRENCE DE L'ARTICLE

L'article a été accepté et publié en ligne le 20 avril 2020 dans le journal « Biofilm ».

Thérien, M., Kiewewalter, H.T., Auria, E., Charron-Lamoureux, V., Wibowo, M., Maróti, G., Kovács, Á.T., Beauregard, P.B. (2020). Surfactin production is not essential for pellicle and root-associated biofilm development of *Bacillus subtilis*. *Biofilm*. 2, 2590-2075.

<https://doi.org/10.1016/j.bioflm.2020.100021>

## 3.2 MANUSCRIT

### 3.2.1 ABSTRACT

Secondary metabolites have an important impact on the biocontrol potential of soil-derived microbes. In addition, various microbe-produced chemicals have been suggested to impact the development and phenotypic differentiation of bacteria, including biofilms. The non-ribosomal synthesized lipopeptide of *Bacillus subtilis*, surfactin, has been described to impact the plant promoting capacity of the bacterium. Here, we investigated the impact of surfactin production on biofilm formation of *B. subtilis* using the laboratory model systems; pellicle formation at the air-medium interface and architecturally complex colony development, in addition to plant root-associated biofilms. We found that the production of surfactin by *B. subtilis* is not essential for pellicle biofilm formation neither in the well-studied strain, NCIB 3610, nor in the newly isolated environmental strains, but lack of surfactin reduces colony expansion. Further, plant root colonization was comparable both in the presence or absence of surfactin synthesis. Our results suggest that surfactin-related biocontrol and plant promotion in *B. subtilis* strains are independent of biofilm formation.

### 3.2.2 INTRODUCTION

Several species from the “*Bacillus subtilis* complex” are well-characterized plant growth-promoting rhizobacteria (PGPRs), providing various beneficial activities for plants and inhibiting fungal and bacterial pathogens [1]. Many strains of *Bacillus subtilis*, *Bacillus amyloliquefaciens* and *Bacillus velezensis* are currently used in organic and traditional agriculture to prevent infection and/or increase yields of various crops [2-4]. These species are of particular interest because they can form stress-resistant endospores, a cell-type ideal for product formulation. Most PGPR *Bacillus spp.* also produce a wide range of bioactive molecules, such as lipopeptides, which directly influences plant growth and defense [5].

Many of these molecules are synthesized by multienzyme-complexes called non-ribosomal peptide synthetases (NRPS) [6]. *B. subtilis* NCIB 3610 possesses 3 NRPS clusters and one NRPS/polyketide synthetase (PKS) cluster, which is few compared to the bioactive molecule synthesis capacity of *B. velezensis* strains [1]. Bacillaene, a broad-spectrum antibiotic, is synthesized by proteins encoded in 80 kB *pksA-S* cluster [7]. The *ppsA-E* encodes for the peptide synthetase responsible for the synthesis of plipastatin (fengycin family), a strong antifungal molecule [5,8], while the siderophore bacillibactin is synthesized by the product of the *dhbA-F* operon [9]. Finally, SrfAA-AD produces versatile molecules from the surfactin family [10].

Surfactin molecules are composed of a heptapeptide, i.e. two acidic and five nonpolar amino acids, interlinked with a  $\beta$ -hydroxy fatty acid, and condensed in a cyclic lactone ring structure [10-11]. The amino acid sequence, the length, and the branching of the fatty acid moiety can vary in surfactin molecules produced by different *Bacillus* species, strains and/or growth conditions [12]. For example, on tomato roots *B. amyloliquefaciens* S499 produces surfactin variants with C<sub>12</sub>, C<sub>13</sub>, C<sub>14</sub> and C<sub>15</sub> acyl chains, the last two composing more than 80% of total surfactins produced in these conditions [13]. Surfactin, as its name suggests, is an extremely

powerful biosurfactant, and thus helps bacteria moving on solid surface [6,14-18]. These molecules are abundantly produced when *B. subtilis* colonizes plant roots, and they elicit the induce systemic resistance in plants [19-22].

A strong link between biofilm formation and surfactin production was suggested for different *Bacillus* species. Mutations in the surfactin synthesis operon were reported to cause partial to severe biofilm defect in *B. velezensis* FZB42 and *B. amyloliquefaciens* UMAF6614 [23-24]. Non-surfactin producer strains of UMAF6614 were also impaired in phylloplane colonization [25]. Under specific laboratory growth conditions (i.e. exponentially growing cells inoculated into lysogeny broth medium), surfactin was shown to trigger biofilm formation in *B. subtilis* via a pore-forming activity, which causes intracellular potassium leakage sensed by KinC that in turns activate the genetic pathway responsible for biofilm formation [26]. This “quorum-sensing like” activity was demonstrated in the model strain NCIB 3610. Similarly to reports in *B. velezensis* and *B. amyloliquefaciens*, a surfactin deletion mutant of *B. subtilis* 6051 was shown to be defective for biofilm formation and root colonization [19]. However, a different study showed that biofilms formed by *B. subtilis* tomato rhizoplane isolates had comparable dry weight among wild-type and surfactin mutants [27]. Finally, deletion of *sfp*, which is known to be involved in the production of surfactin since it encodes for a 4’phosphopantetheinyl transferase that activates the peptidyl carrier protein domains from the NRPS machinery, impairs biofilm formation in *B. subtilis* 3610 [28]. Since *sfp* mutation is defective for the synthesis of all NRP-derived molecules (surfactin, bacillibactin, plipastatin and bacillaene), this impair in biofilm formation could be due to a defect in other biosynthetic pathways than surfactin [14]. These conflicting reports and recent results in our laboratories lead us to revisit the importance of surfactin for biofilm formation of *B. subtilis* *in vitro* and *on planta*.

### 3.2.3 MATERIAL AND METHODS

#### 3.2.3.1 Strains, media, and chemicals

Strains used in the study are listed in **Table S 1**. For routine growth, cells were propagated on lysogeny broth (LB; Luria-Bertani or Lenox broth) medium. When necessary, antibiotics were used at the following concentrations: MLS (1  $\mu\text{g mL}^{-1}$  erythromycin, 25  $\mu\text{g mL}^{-1}$  lincomycin); spectinomycin (100  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ); chloramphenicol (5  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ) and kanamycin (10  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ). New *B. subtilis* isolates were obtained from 5 sampling sites in Germany and Denmark (see **Table S 1** for coordinates) by selecting for spore formers in the soil. Soil samples were mixed with 0.9% saline solution, vortexed on a rotary shaker for 2 min, incubated at 80 °C for 25 min and serially diluted on LB medium solidified with 1.5% agar [29]. Highly structured colonies were targeted and isolation of *B. subtilis* strains was confirmed using 16S sequencing followed by whole genome [30]. These new isolates are all naturally competent allowing easy genetic modification using standard protocol for *B. subtilis* [31]. New isolates and their *srfAC::spec* derivatives (*srfAC::spec* marker was transferred from DS1122 [32]) were labeled with constitutively expressed *gfp* from  $P_{\text{hyperspank}}$  using phyGFP plasmids that integrates into the *amyE* locus [33].

All solvents used for HRMS and chromatography were VWR Chemicals LC-MS grade, while for metabolites extraction the solvents were HPLC grade (VWR Chemicals). Surfactin standard was purchased from Sigma-Aldrich (Cat. No. S3523).

#### 3.2.3.2 Culture conditions

For pellicles assays, cells were pre-grown for 2 h and diluted 1:100 in 3 mL LB 3 times, and at the last incubation cells were grown until they reach an  $\text{OD}_{600}$  between 0.3 and 0.6.  $\text{OD}_{600}$  was then adjusted at 0.3 with LB, and 13.5  $\mu\text{L}$  were used to inoculate 1 mL of medium in a 24-well plates. Media used for these experiments were MSgg [28] and MSNc + Pectin (MSN: 5 mM Potassium phosphate buffer pH7, 0.1 M Mops pH7, 2 mM  $\text{MgCl}_2$ , 0.05 mM  $\text{MnCl}_2$ , 1  $\mu\text{M}$   $\text{ZnCl}_2$ ,

2  $\mu\text{M}$  thiamine, 700  $\mu\text{M}$   $\text{CaCl}_2$ , 0.2%  $\text{NH}_4\text{Cl}$ ; 0,5% cellobiose and 0,5% pectin (Sigma)). Incubation was done at 30 °C. For pellicle assays of recent *B. subtilis* soil isolates and its mutant derivatives, three to four colonies were inoculated in 3 mL LB and incubated at 37 °C with shaking at 225 rpm for 4 h. The  $\text{OD}_{600}$  was adjusted to 1.5 and 1% inoculum of the pre-grown culture was used to seed bacterial biofilms in MSgg [28] or MOLP [34] medium at 30 °C. For colony biofilms, one colony was inoculated in 3 mL LB and rolled for 3 h at 37 °C. The culture was adjusted to an  $\text{OD}_{600}$  of 1, then 2  $\mu\text{L}$  were spotted on solidified (1.5% agar) MSgg medium.

Col-0 *A. thaliana* ecotype (subspecies) was used throughout the study. For **Figure 20** seeds were surface-sterilized with 70% ethanol followed by 0.3% sodium hypochlorite (v/v) and germinated on Murashige and Skoog medium (Sigma) 0.7% agar with 0.05% glucose in a growth chamber at 25 °C. Root colonization assays were performed using MSNg (MSN supplemented with 0.05% glycerol) as described in [35]. For **Figure 21**, *Arabidopsis* seeds were surface sterilized using 2% (v/v) sodium hypochlorite with mixing on an orbital shaker for 20 min and then washed five times with sterile distilled water. The seeds were placed on pre-dried Murashige and Skoog (MS) basal salts mixture (2.2 g  $\text{L}^{-1}$ , Sigma) containing 1% agar in an arrangement of approximately 20 seeds per plate at a minimum distance of 1 cm. After 3 days of incubation at 4 °C, plates were placed at an angle of 65° in a plant chamber (containing five Narva LT 30W T8/865 cool daylight COLOURLUX plus on each shelf) with a light regime of 16 h light (24 °C)/8 h dark (21 °C). After 6 days, homogenous seedlings ranging 0.8-1.2 cm in length were selected for root colonization assay. Seedlings were transferred into 48-well plates containing 270  $\mu\text{L}$  of MSNg medium [35] per well. The wells were supplemented with 30  $\mu\text{L}$  of exponentially growing bacterial culture diluted to  $\text{OD}_{600} = 0.2$ . The sealed plates were incubated at a rotary shaker (90 rpm) at 30 °C for 18 h. After the incubation, plants were washed three times with MSNg to remove non-attaching cells and then transferred to a glass slide for imaging using CLSM.

### 3.2.3.3 Beta-galactosidase assays

From pellicle biofilm assays, spent medium was cautiously removed from the wells. The pellicle was then collected in 1 mL of Z-buffer (40 mM NaHPO<sub>4</sub>; 60 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>; 1 mM MgSO<sub>4</sub>; 10 mM KCl) and transferred in a 1.5 mL tube. The suspensions were sonicated with 1 second pulses (30 % power) for 10 seconds total to break the biofilms, and OD<sub>600</sub> was measured. Then, 2-mercaptoethanol (final concentration of 38 mM) and freshly prepared lysozyme in Z-buffer (final concentration of 20 µg mL<sup>-1</sup>) were added. Suspensions were incubated for 30 min at 30 °C, diluted and 100 µL of an ONPG solution (4 mg mL<sup>-1</sup> in Z-buffer with 38 mM of 2-mercaptoethanol) were added. 250 µL of Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 1 M were added when solutions started turning yellow, and the reaction time was recorded. The A<sub>420nm</sub> and OD<sub>550nm</sub> were measured for each solution, and the Miller Units were calculated using: Miller Units = 1000 × [(A<sub>420nm</sub> - 1.75 × OD<sub>550nm</sub>)] / (T<sub>min</sub> × V<sub>ml</sub> × OD<sub>600</sub>).

### 3.2.3.4 Microscopy

To visualize bacteria on root surfaces for **Figure 20**, seedlings were examined with a Zeiss Axio Observer Z1 microscope equipped with a 20X/0.8 Plan-Apochromat objective, and whole root pictures were taken with a Zeiss AxioCam 506 mono. **Figure 20** presents representative images of the various mutants and times of colonization. The fluorescence signal was detected using a YFP filter (ex: 500/20, em: 535/30) and a CFP filter for autofluorescence of the root (ex: 436/20, em: 480/40). All images were taken at the same exposure time, processed identically for compared image sets, and prepared for presentation using Zeiss Zen 2.0 software. Each image is representative of at least 12 root colonization assays performed in three independent experiments. Quantification was performed using CellProfiler 3.0 (cellprofiler.org) [36].

For **Figure 21**, the washed plant roots were transferred to microscope slides and gently sealed with cover slips. Plant root colonization was analysed with a confocal laser scanning microscope (TCS SP8 (Leica) equipped with an argon laser and a Plan-Apochromat 63x/1.4 Oil objective). Fluorescent reporter excitation was performed at 488 nm for green fluorescence,

while the emitted fluorescence was recorded at 520/23 nm. Single-layer images were acquired and processed with the software ImageJ (National Institutes of Health). Each image is representative of 2 root colonization assays performed in two independent experiments.

#### 3.2.3.5 Chemical extraction of secondary metabolites from bacterial cultures

Bacterial strains were cultured on MSgg agar plates for 3 days at 30 °C. An agar plug (6 mm diameter) of each bacterial cultures was transferred to a vial and extracted with 1 mL of isopropanol:ethyl acetate (1:3, v/v) with 1% formic acid. The vials were placed in an ultrasonic bath at full effect for 60 min. Extracts were then transferred to new vials, evaporated to dryness under N<sub>2</sub>, and re-dissolved in 300 µL of methanol for further sonication over 15 min. After centrifugation at 13400 rpm for 3 min, the supernatants were transferred to new vials and subjected to ultrahigh-performance liquid chromatography-high resolution mass spectrometry (UHPLC-HRMS) analysis.

#### 3.2.3.6 UHPLC-HRMS analysis

UHPLC-HRMS was performed on an Agilent Infinity 1290 UHPLC system equipped with a diode array detector. UV-visible spectra were recorded from 190 to 640 nm. Liquid chromatography of 1 µL extract was performed using an Agilent Poroshell 120 phenyl-hexyl column (2.1 × 150 mm, 2.7 µm) at 60°C with acetonitrile and H<sub>2</sub>O, both buffered with 20 mM formic acid, as mobile phases. Initially, a linear gradient of 10% acetonitrile in H<sub>2</sub>O to 100% acetonitrile over 15 min was employed, followed by isocratic elution of 100% acetonitrile for 2 min. The gradient was returned to 10% acetonitrile in H<sub>2</sub>O in 0.1 min, and finally isocratic condition of 10% acetonitrile in H<sub>2</sub>O for 2.9 min, all at a flow rate of 0.35 mL/min. MS detection was performed in positive ionization on an Agilent 6545 QTOF MS equipped with an Agilent Dual Jet Stream electrospray ion source with a drying gas temperature of 250 °C, drying gas flow of 8 L/min, sheath gas temperature of 300 °C, and sheath gasflow of 12 L/min. Capillary voltage was set to 4000 V and nozzle voltage to 500 V. MS data processing and analysis were performed using Agilent MassHunter Qualitative Analysis B.07.00.

### 3.2.3.7 Genome re-sequencing

Genomic DNA of 3610, SSB46 and MT529 were isolated using Bacterial and Yeast Genomic DNA kit (EURx). Re-sequencing was performed on an Illumina NextSeq instrument using V2 sequencing chemistry (2x150 nt). Base-calling was carried out with “bcl2fastq” software (v.2.17.1.14, Illumina). Paired-end reads were further analyzed in CLC Genomics Workbench Tool 9.5.1. Reads were quality-trimmed using an error probability of 0.05 (Q13) as the threshold. Reads that displayed  $\geq 80\%$  similarity to the reference over  $\geq 80\%$  of their read lengths were used in mapping. Quality-based SNP and small In/Del variant calling was carried out requiring  $\geq 10\times$  read coverage with  $\geq 25\%$  variant frequency. Only variants supported by good quality bases ( $Q \geq 30$ ) on both strands were considered.

## 3.2.4 RESULTS

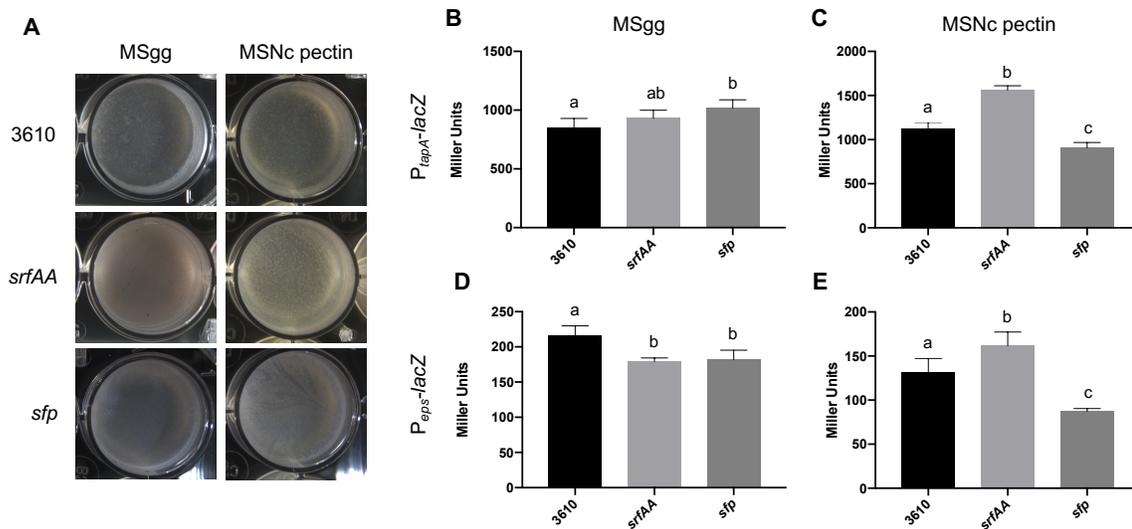
### 3.2.4.1 Absence of surfactin has no effect on pellicle formation of NCIB 3610

To assess the importance of surfactin production for biofilm development, pellicle formation, a biofilm on the air-medium interface was first examine in liquid biofilm-inducing medium, i.e. MSgg and MSNc + pectin. MSgg induces biofilm formation via iron availability and glutamate, while pectin, a plant-derived polysaccharide, is the main environmental cue inducing biofilm formation in MSNc + pectin [35]. Since both media present different cues for the bacterial cells, and that pectin was shown to strongly induce surfactin production [37], importance of this molecule for biofilm formation could vary according to the medium used. As shown in **Figure 18A**, deletion of *srfAA*, and consequently absence of surfactin, does not visibly affect pellicle formation in either liquid media. Similarly, a strain deleted for *sfp*, which is defective for synthesis of all NRP-derived molecules, is also able to form pellicle in both media.

Importantly, the 3610 *srfAA* deletion strain used here was newly created (harbouring a kanamycin resistant gene) and did not match the pellicle formation phenotype of the originally published laboratory stock, 3610 *srfAA::erm* (SSB46; [28]), the latter showing an important

delay in pellicle formation (**Figure S 2**). When the *srfAA::erm* marker was re-introduced into 3610 by SPP1 phage transduction, the newly obtained *srfAA::erm* strain (MT529) displayed comparable pellicle development to 3610 and *srfAA::kan* strains. Consequently, the genomes of 3610, SSB46, and the newly created MT529 strains were re-sequenced. In addition to the *srfAA::erm* mutation, SSB46 strain contained six point mutations that did not exist in the ancestral 3610 or the re-created MT529 strain (see **Table S 2**). However, deletion mutants of the SNP harbouring genes combined with *srfAA::kan* did not recapitulate the important defect observed with SSB46 strain (**Figure S 1**), suggesting that the mutation causing the defect is not a loss-of-function or that certain combination of SNPs are responsible for the observed phenotype of SSB46 strain.

Importance of surfactin and *sfp* for activation of the two main operons involved in biosynthesis of the extracellular matrix, i.e. *tapA-sipW-tasA* and *epsA-O*, was further examined using transcriptional *lacZ* fusions. As shown in **Figure 18B and D**, absence of surfactin or deletion of *sfp* have little to no effect on *tapA* transcription, and slightly decreases *epsA-O* transcription in MSgg. In MSNc pectin, absence of surfactin actually increases *tapA* and *epsA-O* transcription (**Figure 18C**), which also correlates with the more vigorous aspect of pellicles (**Figure 18A**). In the same medium, absence of *sfp* impairs transcription of both biofilm operons. In summary, in liquid media *srfAA* or *sfp* deletion has only mild impacts on pellicle biofilm formation in *B. subtilis* 3610.



**Figure 18 Pellicle formation is mildly affected by *srfAA* or *sfp* deletion**

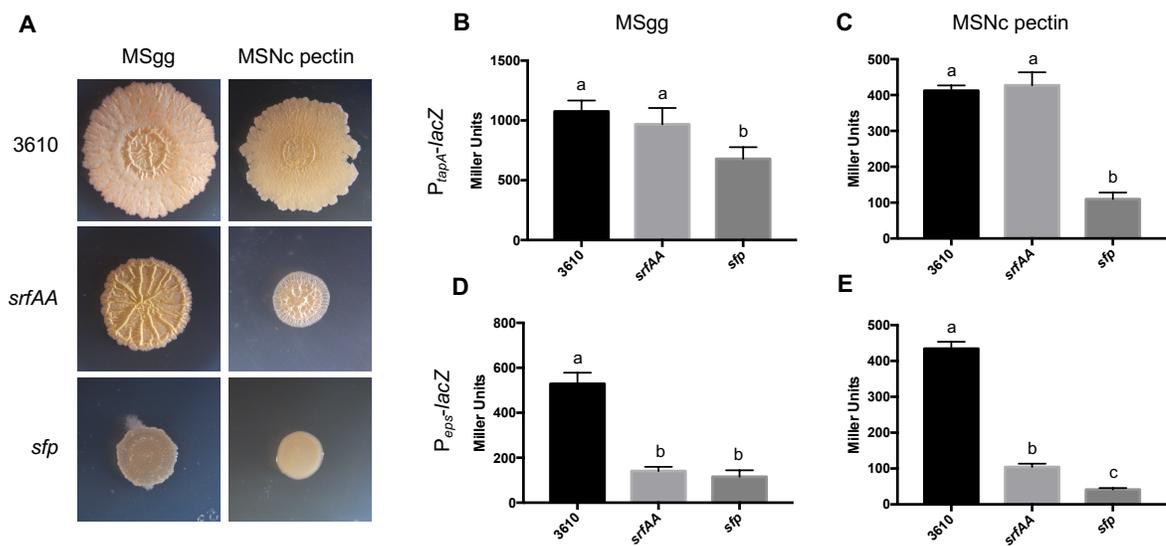
(A) Top-down view of pellicle assay in which the indicated mutants were incubated for 24 h at 30 °C in MSgg or in MSNc + pectin. Results are representative of three experiments. (B-D)  $\beta$ -galactosidase activities of WT (3610), *srfAA* or *sfp* mutant harbouring the  $P_{tapA}$ -lacZ reporter (B and C) or the  $P_{eps}$ -lacZ reporter (D and E). Cells were grown in standing MSgg (B and D) or MSNc + pectin (C and E) pellicles for 20 h. Values represent the mean of five technical replicates, and the experiments are representative of at least three independent biological replicates. Error bars represent standard deviation, and letters represent =  $P < 0.05$ .

### 3.2.4.2 Deletion of *sfp* and *srfAA* alters colony structure

Biofilm strength can also be evaluated using the complex architecture of colony biofilms growing on solid biofilm-inducing media. Since surfactin is a biosurfactant [17,38], its absence might influence colony expansion [17]. Indeed, as shown in **Figure 19A**, colonies of *srfAA* show less spreading on solid MSgg and MSNc pectin, but are still very wrinkly. These wrinkles are likely composed mostly of proteinaceous (TasA) fibres, since expression of Peps is drastically reduced by absence of surfactin, while  $P_{tapA}$  is not affected (**Figure 19B**). Interestingly, the *sfp* mutant produces small, flat colonies in both media. This strain also has significantly reduced LacZ activity for both biofilm reporters ( $P_{tapA}$  and  $P_{eps}$ ) and media, which correspond to the flat phenotype of the colonies. While calculation of the miller units includes normalization for cell

number (OD600), this lack of biofilm gene expression could also be attributable to lack of cell growth and incapacity to reach the cell density required for biofilm formation.

Colony morphology results on solid media clearly show that *srfAA* and *sfp* deletion lead to phenotypes, indicating that in the latter absence of other molecule(s) synthesized via NRP machinery also impacts biofilm formation. Thus, we examined deletion mutants for bacillibactin (*dhbA-F*), plipastatin (*ppsB*) and bacillaene (*pksL*) (**Figure S 2**). The mutant defective for *B. subtilis* siderophore bacillibactin showed small, almost featureless colonies on both media, suggesting an important role for iron-acquisition molecules in this process. The double *srfAA dhbA-F* deletion recapitulated the *sfp* phenotype, suggesting that on solid media, both molecules are required for robust biofilm formation.

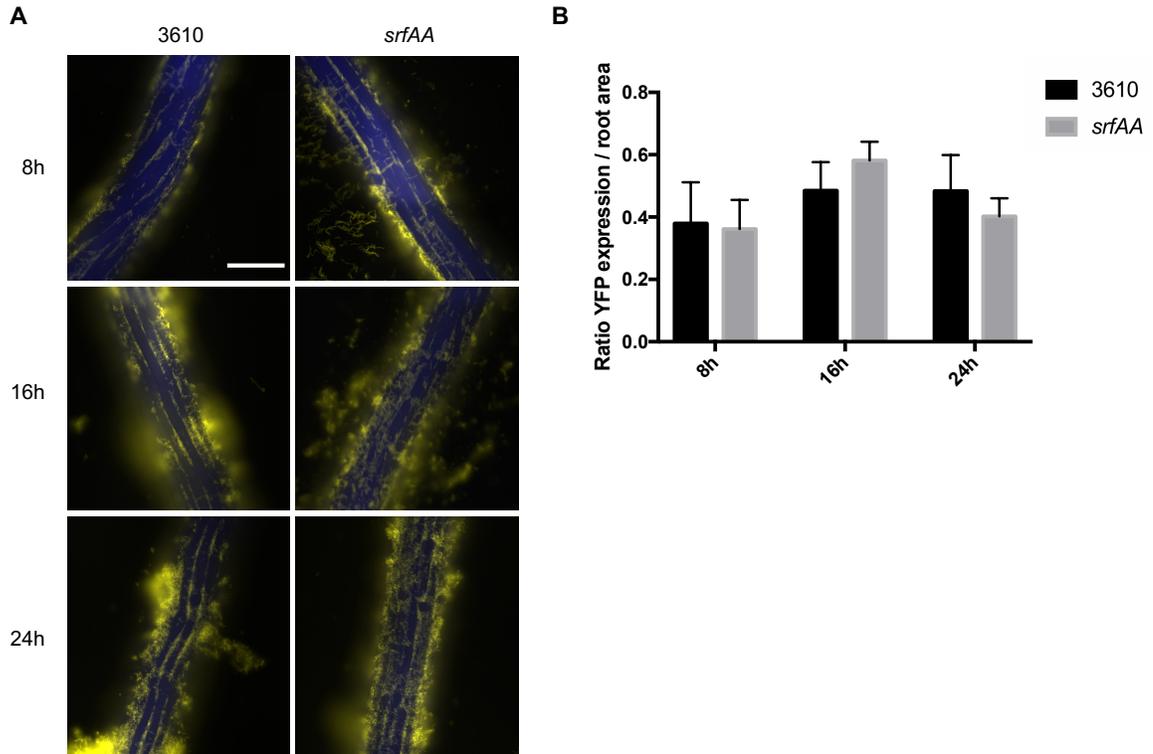


**Figure 19** *srfAA* or *sfp* influences colony formation

**(A)** Top-down view of colonies incubated for 72 h at 30 °C on solid MSgg or MSNc + pectin. Results are representative of three experiments. Scale bar are 5 mm. **(B-D)**  $\beta$ -galactosidase activities of WT (3610), *srfAA* or *sfp* mutant harboring the  $P_{tapA-lacZ}$  reporter (B and C) or the  $P_{eps-lacZ}$  reporter (D and E). Cells were grown on solid MSgg (B and D) or MSNc + pectin (C and E) for 20 h. Values represent the mean of six technical replicates, and the experiments are representative of at least three independent biological replicates. Error bars represent standard deviation, and letters represent =  $P < 0.05$ .

#### 3.2.4.3 Surfactin is not required for root colonization by *B. subtilis*

In a natural environment, surfactin production is triggered by contact with plant roots few hours before biofilm formation [37]. Thus, we evaluated the importance of surfactin for root colonization of *A. thaliana* seedlings, using the system described in [35]. *B. subtilis* root colonization was monitored using a  $P_{\text{tapA}}\text{-yfp}$  reporter, allowing us to identify cells actively forming a biofilm on roots. Since absence of surfactin might only delay, instead of inhibiting, root colonization, different time points after inoculation were examined. As shown in **Figure 20A**, there was no apparent difference in the root colonization patterns and capacities of WT and *srfAA* cells. We validated these observations by imaging whole roots and determining the ratio of YFP expression/root area, which gives us a quantitative measurement of colonization. Indeed, while colonization somewhat varied from one seedling to another, overall there was no significant difference between WT and *srfAA* root colonization at any time points.

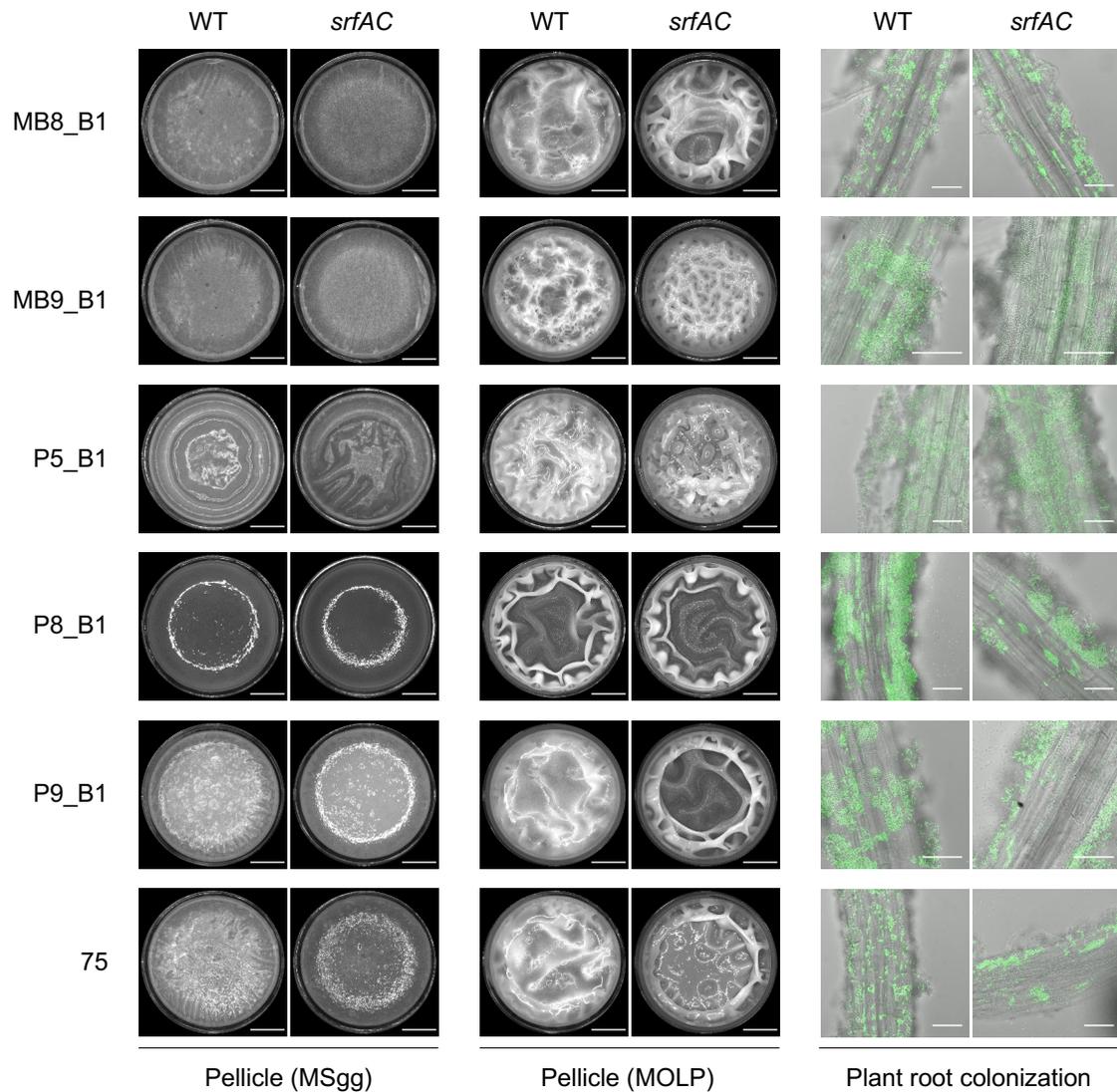


**Figure 20 Surfactin is not required for root colonization**

**(A)** 3610 cells harbouring  $P_{tapA}$ -*yfp* co-incubated with *A. thaliana* seedlings and imaged at 8, 16 and 24 h post-inoculation. Shown are overlays of fluorescence (false-colored green for YFP, and blue for CFP filter – which represents the autofluorescence of roots). Pictures are representative of 12 independent roots. Scale bar is 100  $\mu$ m for all images. **(B)** The entire root was imaged at 20x, and numbers of fluorescent pixels was counted and then divided by the root's area (also measured in pixel), allowing quantification of biofilm-forming cells present on the root. For each strain, the bar represents the mean and standard deviation of at least four technical replicates; experiment is representative of three independent biological replicates. There was no statistical difference between 3610 and *srfAA* in the various conditions.

#### 3.2.4.4 Surfactin is dispensable for pellicle and plant-associated biofilm formation in recent soil *B. subtilis* isolates

To address the generality of lack of surfactin production on pellicle formation ability, we tested pellicle biofilm development of 6 newly isolated *B. subtilis* strains recovered from soil samples. As the essentiality of surfactin production for pellicle development has been demonstrated on MOLP medium for *B. amyloliquefaciens* (previously identified as *B. subtilis*) UMAF6614 [24], pellicle formation was followed both on MSgg and MOLP liquid media that revealed no observable difference between wild-type and their surfactin mutant derivatives (**Figure 21**). Additionally, plant colonization was indistinguishable between the wild-type and *srfAC::spec* strains (**Figure 21**). Finally, to demonstrate the surfactin production ability of these new *B. subtilis* strains, the isolates were inoculated to MSgg medium and UHPLC-HRMS analysis was performed on isopropanol:ethyl acetate extracts of the agar medium below the colonies. Chemical analysis of the extract along with a standard demonstrated that each and every isolates produced surfactin, but not their *srfAC::spec* derivatives (**Figure S 3**).



**Figure 21 Pellicle (in MSgg and MOLP media) and root associated biofilms of newly isolated *B. subtilis* strains (WT columns) and their respective surfactin mutants (*srfAC* columns).**

Scale bars indicate 4 mm and 50  $\mu$ m for pellicle and root colonization images, respectively. Pellicle assays were performed with non-labeled strains, while plant colonization was followed using constitutively expressed GFP from Phyperspank.

### 3.2.5 DISCUSSION

The promiscuous role of secondary metabolites to function as info chemicals has been previously proposed [39–41]. The *B. subtilis* produced surfactin has been reported to lead to induction of biofilm development under non-biofilm inducing conditions [26]. Our results highlight that under biofilm inducing conditions, on liquid or solid biofilm-promoting MSgg and MSNg media, biofilm development of *B. subtilis* 3610 and other newly isolated strains does not require surfactin. Production of both matrix components actually appeared more efficient in MSNc pectin in absence of surfactin, which could be due to the metabolic burden of producing an important NRPs [42,43]. In solid media, *srfAA* and *sfp* mutants display strikingly different phenotypes than WT. In both cases, colony diameter is smaller, stressing the need for surfactin to disperse on a surface [17,18]. Intriguingly, absence of surfactin had a stronger impact on *eps* than on *tapA* transcription, suggesting that surfactin and/or colony spreading might be involved in regulating exopolysaccharides production on solid surface. This regulation would be independent from SinR and AbrB, which act identically on both operons [44].

Similarly to pellicle biofilm formation in liquid media, various *srfA* mutants colonize plant roots with an efficacy identical to WT cells. Surfactin production is stimulated by plant polysaccharides such as pectin, as is biofilm formation [35,37]. Thus, our observations suggest that while surfactin production precedes biofilm formation upon contact between cells and roots, both processes are somewhat independent. They also would have independent roles; biofilms favoring root attachment and surfactin production, triggering the induced systemic resistance.

Our results show that for *B. subtilis*, surfactin production is not required for robust biofilm formation, which is in contradiction with many reports for surfactin requirement in various *Bacilli* [23,24,45]. In many of these reports however, the species or the strain examined also produce an iturin, bacillomycin, which is not the case for *B. subtilis* 3610 or the newly isolated

*B. subtilis* strains [30]. Of note, Luo et al. showed that a *srf* mutant of *Bacillus* spp. 916 produces weaker pellicles in liquid medium, and flat colonies on solid MSgg. However, in this case deletion of *srf* also strongly impairs production of bacillomycin L, which is also required for strong biofilm establishment and rice leaves colonization by *Bacillus* spp. 916 [45]. Thus, requirement of surfactin for biofilm formation and plant colonization is likely species- or strain-specific in *Bacillus*, and might depend on the presence of iturin production in these strains. Nevertheless, the importance of surfactin production by PGPR strains of *Bacilli* is primarily for the anti-microbial potential and systemic resistance induction by this multi-functional secondary metabolite.

### 3.2.6 REFERENCES

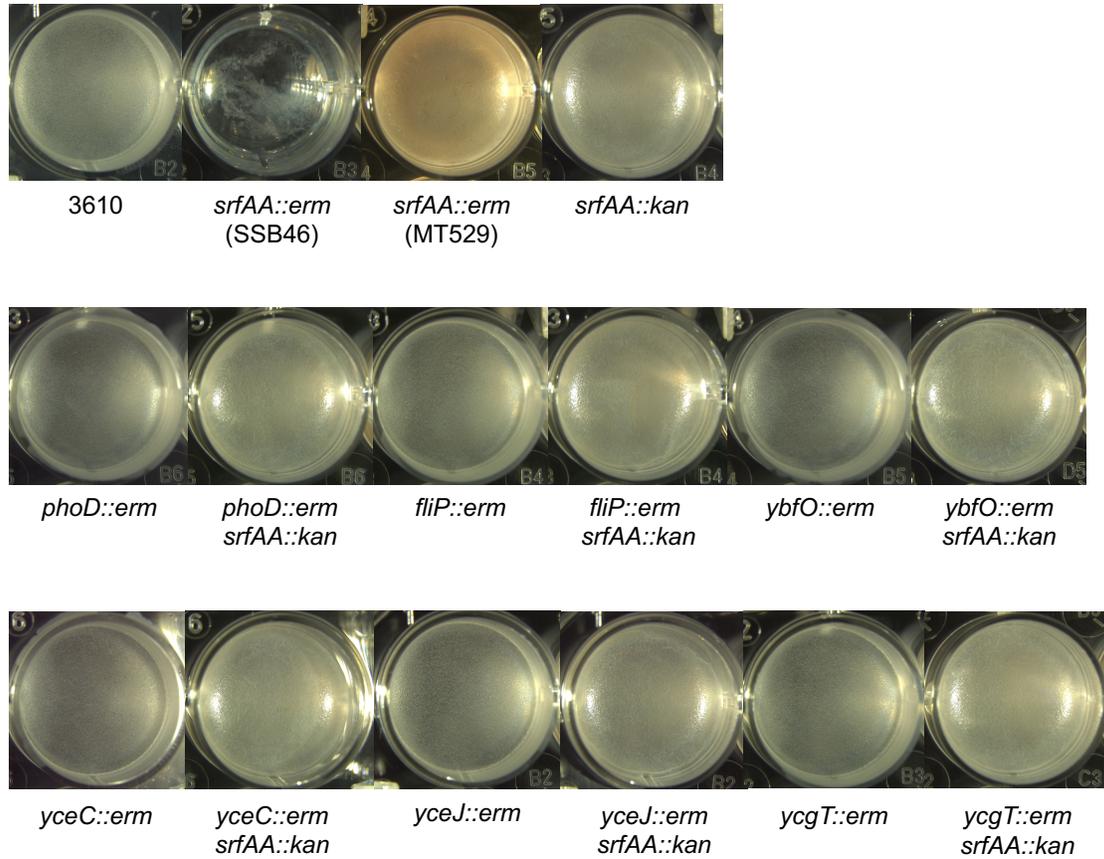
- [1] Fan B, Blom J, Klenk H-P, Borriss R. *Bacillus amyloliquefaciens*, *Bacillus velezensis*, and *Bacillus siamensis* form an “operational group *B. amyloliquefaciens*” within the *B. subtilis* species complex. *Front Microbiol* 2017;8:22. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.00022>.
- [2] Pérez-García A, Romero D, de Vicente A. Plant protection and growth stimulation by microorganisms: biotechnological applications of *Bacilli* in agriculture. *Curr Opin Biotechnol* 2011;22:187–93. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2010.12.003>.
- [3] Aloo BN, Makumba BA, Mbega ER. The potential of *Bacilli* rhizobacteria for sustainable crop production and environmental sustainability. *Microbiol Res* 2019; 219:26–39. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2018.10.011>.
- [4] Borriss R. Use of plant-associated *Bacillus* strains as biofertilizers and biocontrol agents in agriculture. In: Maheshwari DK, editor. *Bact. Agrobiol. Plant growth responses*. Springer; 2011. p. 41–76.
- [5] Ongena M, Jacques P. *Bacillus* lipopeptides: versatile weapons for plant disease biocontrol. *Trends Microbiol* 2008;16:115–25. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2007.12.009>.
- [6] Stein T. *Bacillus subtilis* antibiotics: structures, syntheses and specific functions. *Mol Microbiol* 2005;56:845–57. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2005.04587.x>.
- [7] Straight PD, Fischbach MA, Walsh CT, Rudner DZ, Kolter R. A singular enzymatic megacomplex from *Bacillus subtilis*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2007;104:305–10. <https://doi.org/10.1073/pnas.0609073103>.
- [8] Tosato V, Albertini AM, Zotti M, Sonda S, Bruschi CV. Sequence completion, identification and definition of the fengycin operon in *Bacillus subtilis* 168. *Microbiology* 1997;143:3443–50. <https://doi.org/10.1099/00221287-143-11-3443>.
- [9] Rizzi A, Roy S, Bellenger J-P, Beauregard PB. Iron homeostasis in *Bacillus subtilis* requires siderophore production and biofilm formation. *Appl Environ Microbiol* 2018;85:1–10. <https://doi.org/10.1128/AEM.02439-18>.
- [10] Kraas FI, Helmetag V, Wittmann M, Strieker M, Marahiel MA. Functional dissection of surfactin synthetase initiation module reveals insights into the mechanism of lipoinitiation. *Chem Biol* 2010;17:872–80. <https://doi.org/10.1016/j.chembiol.2010.06.015>.
- [11] Jourdan E, Henry G, Duby F, Dommes J, Barthélémy JP, Thonart P, et al. Insights into the defense-related events occurring in plant cells following perception of surfactin-type lipopeptide from *Bacillus subtilis*. *Mol Plant Microbe Interact* 2009;22: 456–68. <https://doi.org/10.1094/MPMI-22-4-0456>.
- [12] Bartal A, Vigneshwari A, Břoka B, Věroš M, Takáč I, Kredics L, et al. Effects of different cultivation parameters on the production of surfactin variants by a *Bacillus subtilis* strain. *Molecules* 2018;23:2675. <https://doi.org/10.3390/molecules23102675>.
- [13] Nihorimbere V, Cawoy H, Seyer A, Brunelle A, Thonart P, Ongena M. Impact of rhizosphere factors on cyclic lipopeptide signature from the plant beneficial strain *Bacillus amyloliquefaciens* S499. *FEMS Microbiol Ecol* 2012;79:176–91. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6941.2011.01208.x>.

- [14] Shaligram NS, Singhal RS. Surfactin –a review on biosynthesis, fermentation, purification and applications. *Food Technol Biotechnol* 2010;48:119–34. <https://doi.org/10.1093/jxb/erf089>.
- [15] Kearns DB, Losick R. Swarming motility in undomesticated *Bacillus subtilis*. *Mol Microbiol* 2004;49:581–90. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.2003.03584.x>.
- [16] Kovács ÁT, Grau R, Pollitt E.J.G. Surfing of bacterial droplets: *Bacillus subtilis* sliding revisited. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2017;114:E8802. <https://doi.org/10.1073/pnas.1710371114>.
- [17] Grau RR, Oña P De, Kunert M, Leñini C, Gallegos-monterrosa R, Mhatre E, et al. A duo of Potassium-responsive histidine kinases govern the multicellular destiny of *Bacillus subtilis*. *mBio* 2015;6:1–16. <https://doi.org/10.1128/mBio.00581-15>.
- [18] van Gestel J, Vlamakis H, Kolter R. From cell differentiation to cell collectives: *Bacillus subtilis* uses division of labor to migrate. *PLoS Biol* 2015;13:e1002141. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.1002141>.
- [19] Bais HP, Fall R, Vivanco JM. Biocontrol of *Bacillus subtilis* against infection of *Arabidopsis* roots by *Pseudomonas syringae* is facilitated by biofilm formation and surfactin production. *Plant Physiol* 2004;134:307–19. <https://doi.org/10.1104/pp.103.028712.zobacterium>.
- [20] Ongena M, Jourdan E, Adam A, Paquot M, Brans A, Joris B, et al. Brief report Surfactin and fengycin lipopeptides of *Bacillus subtilis* as elicitors of induced. systemic resistance in plants 2007;9:1084–90. <https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2006.01202.x>.
- [21] García-Gutiérrez L, Zeriuoh H, Romero D, Cubero J, de Vicente A, Pérez-García A. The antagonistic strain *Bacillus subtilis* UMAF6639 also confers protection to melon plants against cucurbit powdery mildew by activation of jasmonate- and salicylic acid-dependent defence responses. *Microb Biotechnol* 2013;6:264–74. <https://doi.org/10.1111/1751-7915.12028>.
- [22] Farace G, Fernandez O, Jacquens L, Coutte F, Krier F, Jacques P, et al. Cyclic lipopeptides from *Bacillus subtilis* activate distinct patterns of defence responses in grapevine. *Mol Plant Pathol* 2015;16:177–87. <https://doi.org/10.1111/mpp.12170>.
- [23] Chen XH, Koumoutsi A, Scholz R, Schneider K, Vater J, Süßmuth R, et al. Genome analysis of *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42 reveals its potential for biocontrol of plant pathogens. *J Biotechnol* 2009;140:27–37. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2008.10.011>.
- [24] Zeriuoh H, de Vicente A, Pérez-García A, Romero D. Surfactin triggers biofilm formation of *Bacillus subtilis* in melon phylloplane and contributes to the biocontrol activity. *Environ Microbiol* 2014;16:2196–211. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.12271>.
- [25] Chowdhury SP, Uhl J, Grosch R, Alquères S, Pittroff S, Dietel K, et al. Cyclic lipopeptides of *Bacillus amyloliquefaciens* subsp. plantarum colonizing the lettuce rhizosphere enhance plant defence responses towards the bottom rot pathogen *Rhizoctonia solani*. *Mol Plant Microbe Interact* 2015;28:17–8.
- [26] López D, Fischbach MA, Chu F, Losick R, Kolter R. Structurally diverse natural products that cause potassium leakage trigger multicellularity in *Bacillus subtilis*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2009;106:280–5. <https://doi.org/10.1073/pnas.0810940106>.
- [27] Oslizlo A, Stefanic P, Vatovec S, Beigot Glaser S, Rupnik M, Mandic-Mulec I. Exploring ComQXPA quorum-sensing diversity and biocontrol potential of *Bacillus* spp. isolates from tomato rhizoplane. *Microb Biotechnol* 2015;8:527–40. <https://doi.org/10.1111/1751-7915.12258>.

- [28] Branda SS, González-Pastor JE, Ben-Yehuda S, Losick R, Kolter R. Fruiting body formation by *Bacillus subtilis*. Proc Natl Acad Sci U S A 2001;98:11621–6. <https://doi.org/10.1073/pnas.191384198>.
- [29] Gallegos-Monterrosa R, Mhatre E, Kovács ÁT. Specific *Bacillus subtilis* 168 variants form biofilms on nutrient-rich medium. Microbiology 2016;162:1922–32. <https://doi.org/10.1099/mic.0.000371>.
- [30] Kieseewalter HT, Lozano-Andrade CN, Maróti G, Snyder D, Cooper VS, Jørgensen TS, et al. Complete genome sequences of 13 *Bacillus subtilis* Soil isolates for studying secondary metabolite diversity. Microbiol Resour Announc 2020;9. <https://doi.org/10.1128/MRA.01406-19>.
- [31] Kunst F, Rapoport G. Salt stress is an environmental signal affecting degradative enzyme synthesis in *Bacillus subtilis*. J Bacteriol 1995;177:2403–7. <https://doi.org/10.1128/jb.177.9.2403-2407.1995>.
- [32] Chen R, Guttenplan SB, Blair KM, Kearns DB. Role of the sigmaD-dependent autolysins in *Bacillus subtilis* population heterogeneity. J Bacteriol 2009;191: 5775–84. <https://doi.org/10.1128/JB.00521-09>.
- [33] Van Gestel J, Weissing FJ, Kuipers OP, Kovács ÁT. Density of founder cells affects spatial pattern formation and cooperation in *Bacillus subtilis* biofilms. ISME J 2014; 8:2069–79. <https://doi.org/10.1038/ismej.2014.52>.
- [34] Ahimou F, Jacques P, Deleu M. Surfactin and iturin A effects on *Bacillus subtilis* surface hydrophobicity. Enzym Microb Technol 2000;27:749–54. [https://doi.org/10.1016/S0141-0229\(00\)00295-7](https://doi.org/10.1016/S0141-0229(00)00295-7).
- [35] Beauregard PB, Chai Y, Vlamakis H, Losick R, Kolter R. *Bacillus subtilis* biofilm induction by plant polysaccharides. Proc Natl Acad Sci U S A 2013;110:E1621–30. <https://doi.org/10.1073/pnas.1218984110>.
- [36] Lamprecht MR, Sabatini DM, Carpenter AE. CellProfiler™: free, versatile software for automated biological image analysis. Biotechniques 2007;42:71–5. <https://doi.org/10.2144/000112257>.
- [37] Debois D, Fernandez O, Franzil L, Jourdan E, de Brogniez A, Willems L, et al. Plant polysaccharides initiate underground crosstalk with bacilli by inducing synthesis of the immunogenic lipopeptide surfactin. Environ Microbiol Rep 2015;7:570–82. <https://doi.org/10.1111/1758-2229.12286>.
- [38] Ghelardi E, Salvetti S, Ceragioli M, Gueye S a, Celandroni F, Senesi S. Contribution of surfactin and SwrA to flagellin expression, swimming, and surface motility in *Bacillus subtilis*. Appl Environ Microbiol 2012;78:6540–4. <https://doi.org/10.1128/AEM.01341-12>.
- [39] Davies J. What are antibiotics? Archaic functions for modern activities. Mol Microbiol 1990;4:1227–32.
- [40] Traxler MF, Kolter R. Natural products in soil microbe interactions and evolution. Nat Prod Rep 2015;32:956–70. <https://doi.org/10.1039/C5NP00013K>.
- [41] Romero D, Traxler MF, López D, Kolter R. Antibiotics as signal molecules. Chem Rev 2011;111:5492–505. <https://doi.org/10.1021/cr2000509>.
- [42] Oslizlo A, Stefanic P, Dogsa I, Mandic-Mulec I. Private link between signal and response in *Bacillus subtilis* quorum sensing. Proc Natl Acad Sci U S A 2014;111: 1586–91. <https://doi.org/10.1073/pnas.1316283111>.
- [43] Pollak S, Omer-Bendori S, Even-Tov E, Lipsman V, Bareia T, Ben-Zion I, et al. Facultative cheating supports the coexistence of diverse quorum-sensing alleles. Proc Natl Acad Sci U S A 2016;113:2152–7. <https://doi.org/10.1073/pnas.1520615113>.
- [44] Vlamakis H, Chai Y, Beauregard PB, Losick R, Kolter R. Sticking together: building a biofilm the *Bacillus subtilis* way. Nat Rev Microbiol 2013;11:157–68. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2960>.

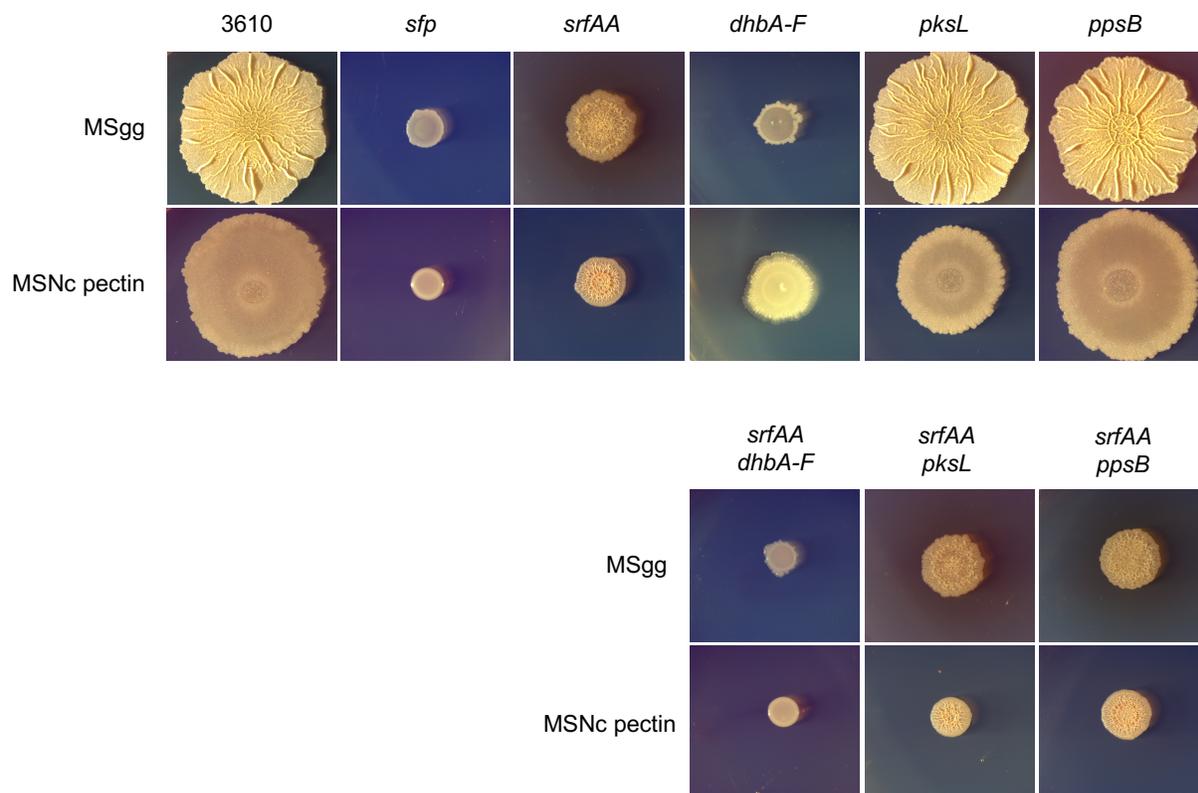
- [45] Luo C, Zhou H, Zou J, Wang X, Zhang R, Xiang Y, et al. Bacillomycin L and surfactin contribute synergistically to the phenotypic features of *Bacillus subtilis* 916 and the biocontrol of rice sheath blight induced by *Rhizoctonia solani*. *Appl Microbiol Biotechnol* 2015;99:1897–910. <https://doi.org/10.1007/s00253-014-6195-4>.

### 3.2.7 SUPPLEMENTARY DATA



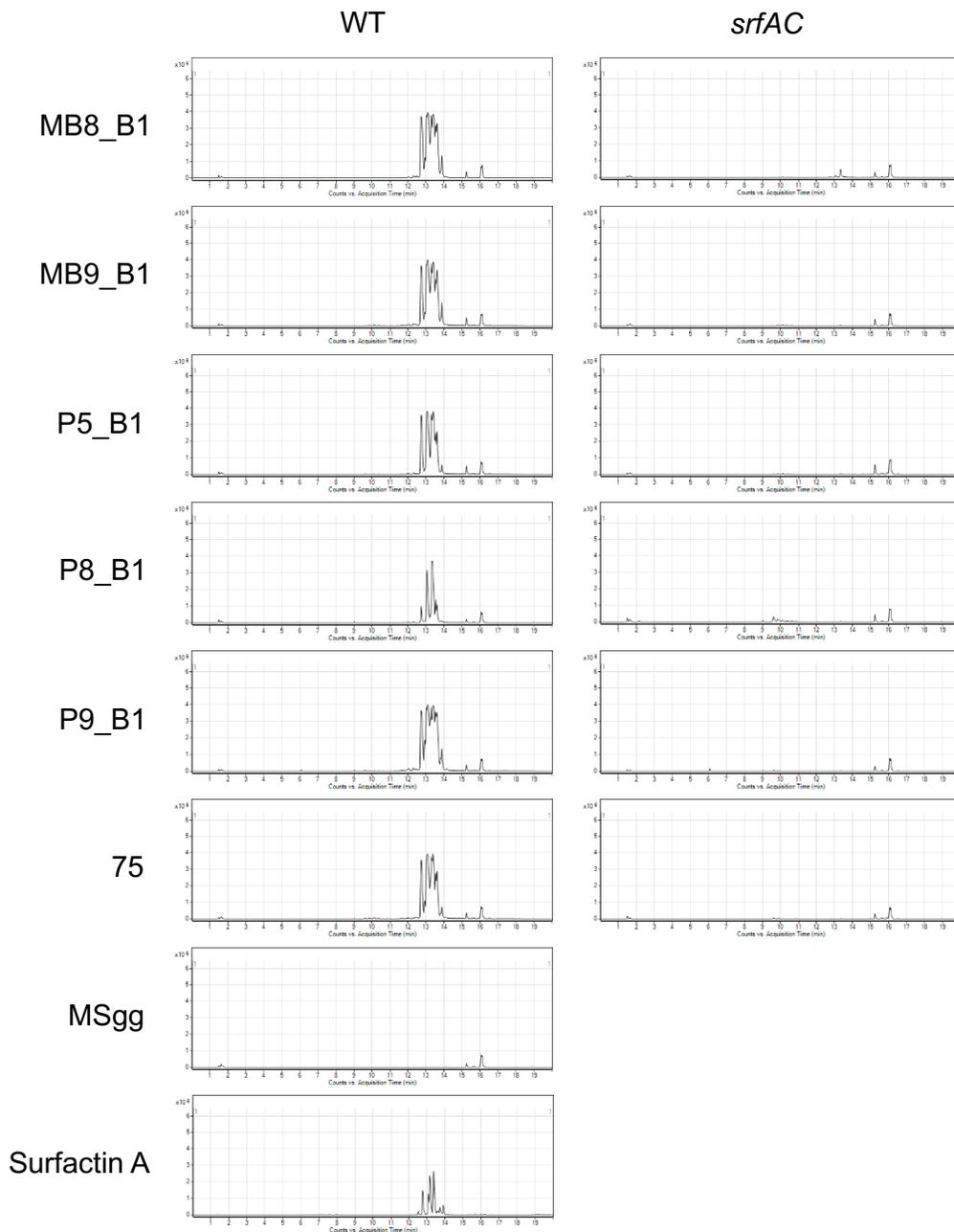
**Figure S 1 Pellicle formation with deletion mutants identified as containing mutations in strain SSB46.**

Pellicles were formed in MSgg for 24 h at 30 °C. Pictures are representative of biological duplicates.



**Figure S 2 Impact of NRPs mutations on colony complexity.**

Top-down view of colonies incubated for 72 h at 30 °C on solid MSgg or MSNc + pectin. Results are representative of at least two experiments. Scale bars are 5 mm.



**Figure S 3** Extracted ion chromatograms ( $m/z$  1000-2000) showing the presence of surfactin produced by the newly isolated *B. subtilis* strains grown on MSgg agar medium and the lack of surfactin production in the *srfAC* derivatives.

The chromatograms of the MSgg medium and the surfactin standard are shown below. Surfactins, iturins and fengycins are all in the  $m/z$  range 1000–2000 that can be detected by ESI-MS [45,46].

**Table S 1 Strains used in this study**

<i>B. subtilis</i> strains	Characteristics	Reference
NCIB 3610	WT/Undomesticated strain	Lab stock
SSB46	3610 <i>srfAA::erm</i>	(Branda et al., 2001)
MT529	3610 <i>srfAA::erm</i> (new transduction in 3610 background)	This study
MT476	3610 <i>srfAA::kan</i>	This study
PB174	<i>amyE::P<sub>tapA</sub>-lacZ</i>	Lab stock
MT644	<i>sfp::erm</i>	BKE03569 (Koo et al., 2017) in 3610
MT619	<i>srfAA::kan amyE::P<sub>tapA</sub>-lacZ</i> (Spec <sup>R</sup> )	This study
MT650	<i>sfp::erm amyE::P<sub>tapA</sub>-lacZ</i> (Spec <sup>R</sup> )	This study
MT607	<i>amyE::P<sub>eps</sub>-lacZ</i> (Chl <sup>R</sup> )	Lab stock
MT613	<i>srfAA::kan amyE::P<sub>eps</sub>-lacZ</i> (Chl <sup>R</sup> )	This study
MT651	<i>sfp::erm amyE::P<sub>eps</sub>-lacZ</i> (Chl <sup>R</sup> )	This study
CA018	<i>amyE::P<sub>tapA</sub>-yfp</i> (Spec <sup>R</sup> )	(Vlamakis et al., 2008)
MT649	<i>srfAA::kan amyE::P<sub>tapA</sub>-yfp</i> (Spec <sup>R</sup> )	This study
MB8_B1	<i>B. subtilis</i> soil isolate from sample site 55.843861, 12.424770	This study
MB9_B1	<i>B. subtilis</i> soil isolate from sample site 55.843861, 12.424770	This study
P5_B1	<i>B. subtilis</i> soil isolate from sample site 55.788800, 12.558300	This study
P8_B1	<i>B. subtilis</i> soil isolate from sample site 55.795200, 12.580600	This study
P9_B1	<i>B. subtilis</i> soil isolate from sample site 55.791200, 12.575100	This study
75	<i>B. subtilis</i> soil isolate from sample site 50.725876, 10.916218	This study
DTUB27	MB8_B1 <i>amyE::P<sub>hyperspank</sub>-gfp</i> (Chl <sup>R</sup> )	This study
DTUB30	MB9_B1 <i>amyE::P<sub>hyperspank</sub>-gfp</i> (Chl <sup>R</sup> )	This study
DTUB38	P5_B1 <i>amyE::P<sub>hyperspank</sub>-gfp</i> (Chl <sup>R</sup> )	This study
DTUB40	P8_B1 <i>amyE::P<sub>hyperspank</sub>-gfp</i> (Chl <sup>R</sup> )	This study
DTUB43	P9_B1 <i>amyE::P<sub>hyperspank</sub>-gfp</i> (Chl <sup>R</sup> )	This study
TB731	75 <i>amyE::P<sub>hyperspank</sub>-gfp</i> (Chl <sup>R</sup> )	This study
DS1122	3610 <i>srfAC::tn10</i> (Spec <sup>R</sup> )	(Chen et al., 2009)
DTUB68	MB8_B1 <i>srfAC::tn10</i> (Spec <sup>R</sup> )	This study
DTUB71	MB9_B1 <i>srfAC::tn10</i> (Spec <sup>R</sup> )	This study
DTUB79	P5_B1 <i>srfAC::tn10</i> (Spec <sup>R</sup> )	This study
DTUB80	P8_B1 <i>srfAC::tn10</i> (Spec <sup>R</sup> )	This study
DTUB82	P9_B1 <i>srfAC::tn10</i> (Spec <sup>R</sup> )	This study
DTUB89	75 <i>srfAC::tn10</i> (Spec <sup>R</sup> )	This study
DTUB146	MB8_B1 <i>srfAC::tn10</i> (Spec <sup>R</sup> ); <i>amyE::P<sub>hyperspank</sub>-gfp</i> (Chl <sup>R</sup> )	This study
DTUB147	MB9_B1 <i>srfAC::tn10</i> (Spec <sup>R</sup> ); <i>amyE::P<sub>hyperspank</sub>-gfp</i> (Chl <sup>R</sup> )	This study
DTUB148	P5_B1 <i>srfAC::tn10</i> (Spec <sup>R</sup> ); <i>amyE::P<sub>hyperspank</sub>-gfp</i> (Chl <sup>R</sup> )	This study
DTUB149	P8_B1 <i>srfAC::tn10</i> (Spec <sup>R</sup> ); <i>amyE::P<sub>hyperspank</sub>-gfp</i> (Chl <sup>R</sup> )	This study
DTUB150	P9_B1 <i>srfAC::tn10</i> (Spec <sup>R</sup> ); <i>amyE::P<sub>hyperspank</sub>-gfp</i> (Chl <sup>R</sup> )	This study
DTUB145	75 <i>srfAC::tn10</i> (Spec <sup>R</sup> ); <i>amyE::P<sub>hyperspank</sub>-gfp</i> (Chl <sup>R</sup> )	This study

[46] Koo B-M, Kritikos G, Farelli JD, Todor H, Tong K, Kimsey H, et al. Construction and analysis of two genome-scale deletion libraries for *Bacillus subtilis*. *Cell Syst* 2017;0:1–15. doi:10.1016/j.cels.2016.12.013.

[47] Vlamakis H, Aguilar C, Losick R, Kolter R. Control of cell fate by the formation of an architecturally complex bacterial community. *Genes Dev* 2008;22:945–53. doi:10.1101/gad.1645008.

**Table S 2 Point mutations detected only in SSB46 (*srfAA::erm*)**

<b>Position</b>	<b>Coding region change</b>	<b>Amino-acid change</b>	<b>Gene</b>
251310	deletion of CT and insertion of TA	Leu430Tyr	<i>ybfO</i>
284231	A to C	Lys59Asn	<i>phoD</i>
312530	Insertion of G	Glu110fs	<i>yceC</i>
319949	C to T		<i>yceJ</i>
353100	deletion of AGCAGCTGATCG	Ile70_Leu73del	<i>ycgT</i>
1705268	G to T		<i>fliP</i>

Positions are indicated in reference to the genome of 3610 (NCBI Gene Bank sequence CP020102.1).



## CHAPITRE 4

### DISCUSSION ET CONCLUSION

À titre de rhizobactérie favorisant la croissance des plantes (PGPR), *B. subtilis* est particulièrement étudiée pour sa capacité à produire de la matrice pour la formation du biofilm. Un réseau de signalisation complexe contrôle la différenciation en types cellulaires spécifiques permettant de réguler l'expression de ses gènes de façon précise au moment opportun. La formation de biofilm nécessite la synthèse de plusieurs éléments fonctionnels métaboliquement coûteux expliquant l'importance des mesures contrôlant l'initiation de ce programme de développement. De plus, ce mode de développement doit s'adapter à l'environnement dynamique, d'où l'existence d'une multitude de réponses à des composés environnementaux servant de signal.

De façon plus précise, la relation bénéfique établie suite à la colonisation des racines de plante par la bactérie semble grandement médiée par des échanges de signaux cellulaires. Notamment, des composés présents dans la rhizosphère, soit excrétés par la plante ou constituants de celle-ci, ont été associés à l'induction de plusieurs comportements chez la bactérie tels que l'attraction et l'induction de la formation du biofilm (Allard-Massicotte et al., 2016; Bais et al., 2006; Beauregard et al., 2013; Chen et al., 2012b; Habib et al., 2017). Par ailleurs, des produits bactériens, majoritairement des métabolites secondaires, ont aussi une incidence dans cette association. En contact avec la plante, ces produits sont particulièrement étudiés pour leur effet sur la santé de celle-ci, car ils peuvent agir comme antibiotiques, des facteurs de croissance et des inducteurs de résistance systémique. (Chowdhury et al., 2015; Ongena et al., 2007; Pérez-García et al., 2011). Cependant, certaines études démontrent aussi un rôle de ces métabolites auto-produits au niveau de la différenciation cellulaire et l'induction de voies de synthèse de *B. subtilis*. Une molécule clé, la surfactine, possède un rôle non

seulement au niveau des bénéfices apportés à la plante, mais aussi auprès de la bactérie. En raison de la multitude de rôles qui lui sont associés, plusieurs modes d'action sont encore peu compris.

Cette étude vise à mieux comprendre la production de surfactine par *B. subtilis* en réponse aux signaux provenant de la plante, plus spécifiquement les polysaccharides présents à la surface des cellules racinaires (la pectine et le xylane). L'utilisation d'un rapporteur transcriptionnel a permis de montrer une hausse de l'activation de la transcription de l'opéron responsable de la surfactine synthétase en réponse à la pectine alors qu'aucune induction n'a été observée pour le xylane. Les résultats obtenus ont démontré que l'effet de la pectine est observable 20 h suivant l'inoculation des bactéries sur un milieu contenant le polysaccharide. De plus, une analyse de qRT-PCR réalisée à 12, 16 et 24 h de production de biofilm en MSgg, MSNc et MSNc + pectine (Carrier, 2018) a précédemment permis de confirmer l'induction transcriptionnelle de la synthèse de surfactine. Celle-ci montre une accumulation d'ARNm de *sfAA* dans le biofilm (**Figure A 1**). On remarque que l'accumulation a lieu vers 16 h (non présente à 12 et 24 h), alors que l'induction du promoteur se fait de 14 à 20 h (**Figure 16**) (les autres moments n'ayant pas été vérifiés dans cette étude). Il est possible que l'activation de  $P_{sfAA}$  plus tôt dans la formation du biofilm mène à l'accumulation d'ARNm observée à 16 h par qRT-PCR. L'activation maximale du promoteur à 20 h permettrait une accumulation d'ARNm qui serait observable avant 24 h. Ces résultats suggèrent qu'une accumulation de l'ARNm de la surfactine synthétase s'effectuerait en moins de 4 h puisque celle-ci n'est plus visible à 24 h. Évidemment, il serait intéressant d'observer ce mécanisme de transcription avec des points d'analyse plus rapprochés. Il serait possible qu'une sécrétion du lipopeptide efficace dès les premiers stades de colonisation contribue grandement à la protection de la plante telle que proposée précédemment (Pertot et al., 2013).

Ces résultats concordent avec ce qui a précédemment été observé chez *B. amyloliquefaciens* (Debois et al., 2015) qui montrait une augmentation de surfactine produite en réponse à la

pectine. Il a aussi été observé que la pectine induit la surfactine dans les premières heures du développement du biofilm via un contrôle transcriptionnel qui serait possiblement indépendant de ComA, acteur de la voie de régulation connue de ComQXP. Une quantification de la production de surfactine dans la phase précédant la formation du biofilm ainsi que dans les phases précoces de son développement est nécessaire afin de confirmer cette hypothèse. Ces informations soulignent l'importance des polysaccharides de plante et leur implication dans la formation de biofilm (Beauregard et al., 2013; Habib et al., 2017) et indiquent que ces glucides jouent un rôle dans la relation entre la plante et les bactéries.

Debois et al. (2015) observe aussi que le xylane induit la production de surfactine. Cependant ici nous n'avons pas observé d'activation du promoteur de *srfAA* en présence de ce polysaccharide. Puisque *B. subtilis* est phylogénétiquement proche de *B. amyloliquefaciens*, il est fort probable que le xylane mène aussi à la synthèse de surfactine. Ceci suggère que l'influence de ces deux polysaccharides est différente. Il est possible que le xylane induise la transcription de *srfAA-D* mais à des temps qui n'ont pas été mesurés dans nos études. Ou encore, la production de surfactine en présence de xylane impliquerait un contrôle post-transcriptionnel.

L'incidence qu'a la plante sur la production de surfactine mène à vouloir mieux comprendre le rôle de cette molécule dans la formation de biofilm et la colonisation. Il a été démontré que la surfactine pouvait induire la production de matrice extracellulaire chez *B. subtilis* (López et al., 2009b; Zerouh et al., 2014). Certaines études relatent qu'elle serait nécessaire à la formation du biofilm et à la colonisation d'un milieu solide (Kinsinger et al., 2005) et liquide (Fan et al., 2017), des racines de tomates (Chen et al., 2012a) de riz (Luo et al., 2015) et d'*Arabidopsis thaliana* (Bais et al., 2004b) et de la phylloplane du melon (Zerouh et al., 2014). Les résultats obtenus dans notre étude ne sont cependant pas en concordance avec certaines de ces observations.

Plusieurs études relatant l'importance de la surfactine dans la formation du biofilm portent sur des espèces (e.g. *B. amyloliquefaciens*) ou bien des souches différentes de celle utilisée dans cette études, *B. subtilis* NCIB 3610. Dans certaines de ces études, la souche utilisée possède des gènes qui ne se retrouvent pas chez la souche NCIB 3610. Par exemple, on retrouve chez la souche *B. subtilis* 916 un gène codant pour la bacillomycine, connue comme étant impliquée pour l'établissement du biofilm. La délétion de *srf* chez la souche *B. subtilis* 916 affecte aussi la production de la bacillomycine ce qui pourrait expliquer les effets observés (Luo et al., 2015). Par ailleurs, en raison de ces différences génétiques, la matrice produite par différentes souches n'arbore pas nécessairement la même composition, apparence ou robustesse. Ainsi, il est probable que l'importance de la surfactine varie entre les différentes souches de *B. subtilis*.

Chez la souche sauvage *B. subtilis* NCIB 3610 étudiée selon les conditions de cette étude, la surfactine n'est pas nécessaire à la formation de pellicule ni à la colonisation de racine et la formation de biofilm subséquente. On remarque par contre un phénotype différent pour le mutant  $\Delta srfAA$  lors d'une croissance en milieu solide. Dans ce cas, la production de biofilm ne semble pas affectée mais on remarque un étalement moindre, probablement dû à l'absence des propriétés tensioactives de la surfactine, et non à titre de molécule signal. Comme l'étude de la colonisation de racines se fait en milieu hydroponique, cette différence entre les phénotypes obtenus avec les trois modèles d'études (pellicule, biofilm sur milieu solide et biofilm sur la racine) pourrait être expliquée par le fait que le contact avec la racine et la colonisation se font grâce à la motilité flagellaire (*swimming*) comme démontré précédemment (Allard-Massicotte et al., 2016) et qu'ainsi, le déplacement de surface (*sliding* et *swarming*) qui se fait à l'aide de la surfactine (Kearns et Losick, 2003; Kinsinger et al., 2003) n'est pas nécessaire pour se diriger vers la plante ni pour s'étendre sur la surface des racines. Le biofilm produit par une souche mutée pour la production de surfactine se développe et persiste tout autant sur la racine que celui de la souche WT. Il n'a pas été démontré si le développement d'un biofilm en terre nécessitait la présence de la molécule. Par ailleurs, la

capacité de la surfactine à induire la formation du biofilm par un mécanisme signalétique précédemment démontrée (López et al., 2009b) ne serait donc pas essentielle. Ce signal ne serait pas impliqué, ou du moins ne serait pas le seul à agir dans nos conditions expérimentales. D'ailleurs, d'autres signaux agissant sur la production de matrice sont déjà connus e.g. les polysaccharides de plantes (Beauregard et al., 2013; Habib et al., 2017) et l'acide malique (Chen et al., 2012b).

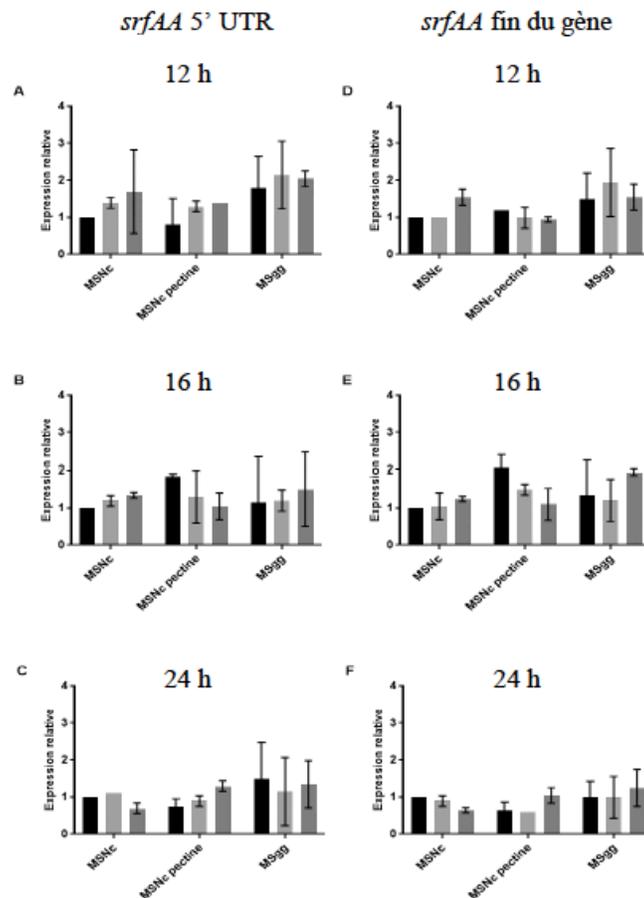
La réalisation de notre étude a par ailleurs mis en évidence certaines incohérences parmi les souches délétées pour la production de surfactine utilisées précédemment, ce qui expliquerait en partie que nos résultats ne correspondent pas à ce qui a déjà été publié. Ainsi, nous avons construit un nouveau mutant (*surfAA::kan*) qui a permis de montrer que, contrairement à ce qui avait été suggéré, la présence de surfactine n'est pas essentielle à la production du biofilm. Une des souches utilisées précédemment (*surfAA::mIs*) contenait plusieurs mutations ponctuelles supplémentaires expliquant en partie la différence entre les résultats obtenus. Finalement, par le passé, un mutant délété pour *sfp*, codant pour une protéine impliquée dans la synthèse de plusieurs NRPS dont la surfactine, a été utilisé afin d'étudier les effets d'une délétion pour la surfactine. Cependant, une analyse plus approfondie démontre que ces mutations ne sont pas équivalentes et qu'un mutant  $\Delta sfp$  sera compromis pour la production d'autres métabolites en plus de la surfactine. Par ailleurs, la souche domestiquée *B. subtilis* 168 comportant plusieurs mutations ponctuelles dans *sfp* a perdu sa capacité à former du biofilm (Fan et al., 2018).

En somme, il est démontré dans la littérature que la surfactine a des effets bénéfiques au sein de la relation entre la plante et la bactérie. Ensemble, les résultats présentés dans cette étude démontrent que ces fonctions bénéfiques ne sont pas dues à la formation de biofilm, puisque le rôle de la surfactine dans ce processus est au mieux très limité. Il est cependant suggéré que la fonction de surfactant du métabolite est utile au niveau du déplacement en milieu solide. La fonction antibiotique permet aussi de compétitionner contre les autres organismes dans la

rhizosphère ainsi que de participer à la protection de la plante contre les organismes pathogènes, cette défense étant amplifiée par l'induction de la résistance systémique chez la plante (Cawoy et al., 2015; Fan et al., 2017)

Nous souhaitons poser un nouveau regard sur l'importance qui est accordée à cette molécule. Bien qu'elle ne semble pas essentielle au développement d'un biofilm, il reste fort à croire qu'elle demeure impliquée lorsque la bactérie évolue au sein de la rhizosphère, possiblement aussi dans les échanges de signaux chimiques avec la plante. Les voies impliquées demeurent toutefois à élucider afin de comprendre la complexité de ces échanges. L'étendue des rôles associés à la surfactine est particulièrement large. Son rôle de molécule signal mérite une étude plus approfondie afin de permettre de comprendre les effets de sa sécrétion sur la population bactérienne même, mais aussi sur la communication avec un hôte végétal. Il serait aussi intéressant de repenser certaines notions acquises concernant ces rôles afin de confirmer si les observations ayant été faites précédemment relèvent bien seulement de la délétion du complexe *srfAA-D* ou bien d'un ensemble de défauts fonctionnels. Cela permettra d'avoir une fondation solide, validant les notions actuelles, afin d'être en mesure de comparer de nouveaux résultats. Nous espérons ainsi pouvoir contribuer à l'amélioration des connaissances fondamentales relatives à la surfactine.

## ANNEXES



**Figure A 1 Expression relative du gène de la sous-unité A de la surfactine synthétase (*srfAA*)**

Analyse de l'implication de la protéine chaperonne Hfq dans la synthèse de l'ARNm de la sous-unité A de la surfactine synthétase (*srfAA*) par un RT-qPCR du gène *srfAA*. L'analyse porte sur la souche contrôle (WT, noir) et la souche de surproduction de la protéine Hfq (*P<sub>hyperspank</sub>-hfq*) non induite (gris pâle) ou induite (gris foncé) avec 500  $\mu$ M d'IPTG lors de la formation de biofilm en MSNc, MSNc + 0,5% pectine et MSggy gélosé. L'amplification du 5' UTR et de la fin du gène permet de confirmer la stabilité de l'ARNm. La figure permet aussi d'observer une accumulation d'ARNm de *srfAA* en MSNc + pectine à 16 h, en concordance avec les résultats présentés dans la présente étude. **A, B, C**) Expression relative du gène *srfAA* pour les amorces présentes 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 présentes à la fin du gène à 12 h, 16 h et 24 h. L'expression relative est calculée selon la formule  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  où le Ct (cycle de seuil) d'un gène de référence (*defA*) est soustrait à celui du gène étudié. La comparaison des données est réalisée à l'aide d'un test ANOVA. Les résultats obtenus par la surproduction de Hfq sont tous non significatifs ( $P \geq 0,05$ ). Figure tirée de Carrier (2018)



## BIBLIOGRAPHIE

- Abdelzاهر, H.M.A. (2003). Biological control of root rot of cauliflower (caused by *Pythium ultimum* var. *ultimum*) using selected antagonistic rhizospheric strains of *Bacillus subtilis*. *New Zeal. J. Crop Hortic. Sci.* **31**, 209–220.
- Ahemad, M. et Kibret, M. (2014). Mechanisms and applications of plant growth promoting rhizobacteria: Current perspective. *J. King Saud Univ. - Sci.* **26**, 1–20.
- Algburi, A., Zehm, S., Natrebov, V., Bren, A.B., Chistyakov, V. et Chikindas, M.L. (2016). Subtilosin Prevents Biofilm Formation by Inhibiting Bacterial Quorum Sensing. *Probiotics Antimicrob. Proteins* **9**, 80–90.
- Allard-Massicotte, R., Tessier, L., Lécuyer, F., Lakshmanan, V. et Lucier, J.-F. (2016). *Bacillus subtilis* Early Colonization of *Arabidopsis thaliana* Roots. **7**, e01664-16.
- Aloo, B.N., Makumba, B.A. et Mbega, E.R. (2019). The potential of Bacilli rhizobacteria for sustainable crop production and environmental sustainability. *Microbiol. Res.* **219**, 26–39.
- Angelini, T.E., Roper, M., Kolter, R., Weitz, D.A. et Brenner, M.P. (2009). *Bacillus subtilis* spreads by surfing on waves of surfactant. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **106**, 18109–18113.
- Araújo, F.F., Henning, A.A. et Hungria, M. (2005). Phytohormones and antibiotics produced by *Bacillus subtilis* and their effects on seed pathogenic fungi and on soybean root development. *World J. Microbiol. Biotechnol.* **21**, 1639–1645.
- Arjes, H.A., Vo, L., Dunn, C.M., Willis, L., DeRosa, C.A., Fraser, C.L., Kearns, D.B. et Huang, K.C. (2020). Biosurfactant-Mediated Membrane Depolarization Maintains Viability during Oxygen Depletion in *Bacillus subtilis*. *Curr. Biol.*
- Arkipova, T.N., Veselov, S.U., Melentiev, A.I., Martynenko, E. V. et Kudoyarova, G.R. (2005). Ability of bacterium *Bacillus subtilis* to produce cytokinins and to influence the growth and endogenous hormone content of lettuce plants. *Plant Soil* **272**, 201–209.
- Arnauteli, S., MacPhee, C.E. et Stanley-Wall, N.R. (2016). Just in case it rains: building a hydrophobic biofilm the *Bacillus subtilis* way. *Curr. Opin. Microbiol.* **34**, 7–12.
- Asally, M., Kittisopikul, M., Rué, P., Du, Y., Hu, Z., Çağatay, T., Robinson, A.B., Lu, H., Garcia-Ojalvo, J. et Süel, G.M. (2012). Localized cell death focuses mechanical forces during 3D patterning in a biofilm. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **109**, 18891–18896.
- Atluri, S., Ragkousi, K., Cortezzo, D.E. et Setlow, P. (2006). Cooperativity Between Different Nutrient Receptors in Germination of Spores of *Bacillus subtilis* and Reduction of This Cooperativity by Alterations in the GerB Receptor. *J. Bacteriol.* **188**, 28–36.
- Badri, D. V. et Vivanco, J.M. (2009). Regulation and function of root exudates. *Plant, Cell Environ.* **32**, 666–681.
- Bais, H.P., Park, S.W., Weir, T.L., Callaway, R.M. et Vivanco, J.M. (2004a). How plants communicate using the underground information superhighway. *Trends Plant Sci.* **9**, 26–32.

- Bais, H.P., Fall, R. et Vivanco, J.M. (2004b). Biocontrol of *Bacillus subtilis* against Infection of *Arabidopsis* Roots by *Pseudomonas syringae* Is Facilitated by Biofilm Formation and Surfactin Production. *Plant Physiol.* *134*, 307–319.
- Bais, H.P., Weir, T.L., Perry, L.G., Gilroy, S. et Vivanco, J.M. (2006). The role of root exudates in rhizosphere interactions with plants and other organisms. *Annu. Rev. Plant Biol.* *57*, 233–266.
- Bartal, A., Vigneshwari, A., Bóka, B., Vörös, M., Takács, I., Kredics, L., Manczinger, L., Varga, M., Vágvölgyi, C. et Szekeres, A. (2018). Effects of different cultivation parameters on the production of surfactin variants by a *Bacillus subtilis* strain. *Molecules* *23*, 2675.
- Bashan, Y. et De-Bashan, L.E. (2002). Protection of Tomato Seedlings against Infection by *Pseudomonas syringae* pv. Tomato by Using the Plant Growth-Promoting Bacterium *Azospirillum brasilense*. *Appl. Environ. Microbiol.* *68*, 2637–2643.
- Beauregard, P.B., Chai, Y., Vlamakis, H., Losick, R. et Kolter, R. (2013). *Bacillus subtilis* biofilm induction by plant polysaccharides. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *110*, E1621-1630.
- Bhattacharyya, P.N. et Jha, D.K. (2012). Plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR): Emergence in agriculture. *World J. Microbiol. Biotechnol.* *28*, 1327–1350.
- Bloemberg, G. V. et Lugtenberg, B.J.J. (2001). Molecular basis of plant growth promotion and biocontrol by rhizobacteria. *Curr. Opin. Plant Biol.* *4*, 343–350.
- Branda, S.S., González-Pastor, J.E., Ben-Yehuda, S., Losick, R. et Kolter, R. (2001). Fruiting body formation by *Bacillus subtilis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *98*, 11621–11626.
- Branda, S.S., Vik, Å., Friedman, L. et Kolter, R. (2005). Biofilms: The matrix revisited. *Trends Microbiol.* *13*, 20–26.
- Branda, S.S., Chu, F., Kearns, D.B., Losick, R. et Kolter, R. (2006). A major protein component of the *Bacillus subtilis* biofilm matrix. *Mol. Microbiol.* *59*, 1229–1238.
- Braud, A., Jézéquel, K., Bazot, S. et Lebeau, T. (2009). Enhanced phytoextraction of an agricultural Cr- and Pb-contaminated soil by bioaugmentation with siderophore-producing bacteria. *Chemosphere* *74*, 280–286.
- Bridier, A., Le Coq, D., Dubois-Brissonnet, F., Thomas, V., Aymerich, S. et Briandet, R. (2011). The spatial architecture of *Bacillus subtilis* biofilms deciphered using a surface-associated model and in Situ imaging. *PLoS One* *6*.
- Cairns, L.S., Hobbey, L. et Stanley-wall, N.R. (2014). Biofilm formation by *Bacillus subtilis*: New insights into regulatory strategies and assembly mechanisms. *Mol. Microbiol.* *93*, 587–598.
- Calvio, C., Celandroni, F., Ghelardi, E., Amati, G., Salvetti, S., Ceciliani, F., Galizzi, A. et Senesi, S. (2005). Swarming differentiation and swimming motility in *Bacillus subtilis* are controlled by *swrA*, a newly identified dicistronic operon. *J. Bacteriol.* *187*, 5356–5366.
- Carrier, J. (2018). Implication d'hfq dans la formation de biofilm et dans la colonisation des racines de plantes chez *Bacillus subtilis*. Mémoire de maîtrise, Université de Sherbrooke, Sherbrooke.
- Carrillo, C., Teruel, J.A., Aranda, F.J. et Ortiz, A. (2003). Molecular mechanism of membrane permeabilization by the peptide antibiotic surfactin. *Biochim. Biophys. Acta* *1611*, 91–97.
- Carvalho, F.P. (2017). Pesticides, environment, and food safety. *Food Energy Secur.* *6*, 48–60.

- Caulier, S., Nannan, C., Gillis, A., Licciardi, F., Bragard, C. et Mahillon, J. (2019). Overview of the antimicrobial compounds produced by members of the *Bacillus subtilis* group. *Front. Microbiol.* *10*, 302.
- Cawoy, H., Debois, D., Franzil, L., De Pauw, E., Thonart, P. et Ongena, M. (2015). Lipopeptides as main ingredients for inhibition of fungal phytopathogens by *Bacillus subtilis/amyloliquefaciens*. *Microb. Biotechnol.* *8*, 281–295.
- Cazorla, F.M., Romero, D., Pérez-García, A., Lugtenberg, B.J.J., de Vicente, A. et Bloemberg, G. (2007). Isolation and characterization of antagonistic *Bacillus subtilis* strains from the avocado rhizoplane displaying biocontrol activity. *J. Appl. Microbiol.* *103*, 1950–1959.
- Chai, Y., Kolter, R. et Losick, R. (2009). Paralogous Antirepressors Acting on the Master Regulator for Biofilm Formation in *Bacillus subtilis*. *Mol. Microbiol.* *74*, 876–887.
- Chai, Y., Norman, T., Kolter, R. et Losick, R. (2011). Evidence that metabolism and chromosome copy number control mutually exclusive cell fates in *Bacillus subtilis*. *EMBO J.* *30*, 1402–1413.
- Chandler, S., Van Hese, N., Coutte, F., Jacques, P., Höfte, M. et De Vleeschauwer, D. (2015). Role of cyclic lipopeptides produced by *Bacillus subtilis* in mounting induced immunity in rice (*Oryza sativa* L.). *Physiol. Mol. Plant Pathol.* *91*, 20–30.
- Charron-Lamoureux, V. et Beaugard, P.B. (2019). *Arabidopsis thaliana* seedlings influence *Bacillus subtilis* spore formation. *Mol. Plant-Microbe Interact.* *32*, 1188–1195.
- Chen, R., Guttenplan, S.B., Blair, K.M. et Kearns, D.B. (2009). Role of the sigmaD-dependent autolysins in *Bacillus subtilis* population heterogeneity. *J. Bacteriol.* *191*, 5775–5784.
- Chen, Y., Yan, F., Chai, Y., Liu, H., Kolter, R., Losick, R. et Guo, J.H. (2012a). Biocontrol of tomato wilt disease by *Bacillus subtilis* isolates from natural environments depends on conserved genes mediating biofilm formation. *Environ. Microbiol.* *15*, 848–864.
- Chen, Y., Shugeng, C., Yunrong, C., Clardy, J., Kolter, R., Jian-hua, G. et Losick, R. (2012b). A *Bacillus subtilis* Sensor Kinase Involved in Triggering Biofilm Formation on the Roots of Tomato Plants. *Mol. Microbiol.* *85*, 418–430.
- Chowdhury, S.P., Hartmann, A., Gao, X.W. et Borriss, R. (2015). Biocontrol mechanism by root-associated *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42 - A review. *Front. Microbiol.* *6*.
- Chu, F., Kearns, D.B., Branda, S.S., Kolter, R. et Losick, R. (2006). Targets of the master regulator of biofilm formation in *Bacillus subtilis*. *Mol. Microbiol.* *59*, 1216–1228.
- Chu, F., Kearns, D.B., McLoon, A., Chai, Y., Kolter, R. et Losick, R. (2008). A novel regulatory protein governing biofilm formation in *Bacillus subtilis*. *Mol. Microbiol.* *68*, 1117–1127.
- Compant, S., Clément, C. et Sessitsch, A. (2010). Plant growth-promoting bacteria in the rhizo- and endosphere of plants: Their role, colonization, mechanisms involved and prospects for utilization. *Soil Biol. Biochem.* *42*, 669–678.
- Compant, S., Samad, A., Faist, H. et Sessitsch, A. (2019). A review on the plant microbiome: Ecology, functions, and emerging trends in microbial application. *J. Adv. Res.* *19*, 29–37.
- Cosmina, P., Rodriguez, F., de Ferra, F., Grandi, G., Perego, M., Venema, G. et van Sinderen, D. (1993). Sequence and analysis of the genetic locus responsible for surfactin synthesis in *Bacillus subtilis*. *Mol. Microbiol.* *8*, 821–831.

- Danhorn, T. et Fuqua, C. (2007). Biofilm Formation by Plant-Associated Bacteria. *Annu. Rev. Microbiol.* *61*, 401–422.
- Debois, D., Jourdan, E., Smargiasso, N., Thonart, P., De Pauw, E. et Ongena, M. (2014). Spatiotemporal monitoring of the anti-biome secreted by *Bacillus* biofilms on plant roots using MALDI mass spectrometry imaging. *Anal. Chem.* *86*, 4431–4438.
- Debois, D., Fernandez, O., Franzil, L., Jourdan, E., de Brogniez, A., Willems, L., Clément, C., Dorey, S., De Pauw, E. et Ongena, M. (2015). Plant polysaccharides initiate underground crosstalk with bacilli by inducing synthesis of the immunogenic lipopeptide surfactin. *Environ. Microbiol. Rep.* *7*, 570–582.
- Deleu, M., Bouffioux, O., Razafindralambo, H., Paquot, M., Hbid, C., Thonart, P., Jacques, P. et Brasseur, R. (2003). Interaction of surfactin with membranes: A computational approach. *Langmuir* *19*, 3377–3385.
- Demain, A.L. et Fang, A. (2000). The natural functions of secondary metabolites. *Adv. Biochem. Eng. Biotechnol.* *69*, 1–39.
- Deng, Y., Chen, H., Li, C., Xu, J., Qi, Q., Xu, Y., Zhu, Y., Zheng, J., Peng, D., Ruan, L., et al. (2019). Endophyte *Bacillus subtilis* evade plant defense by producing lantibiotic subtilomycin to mask self-produced flagellin. *Commun. Biol.* *2*, 1–12.
- Devi, K.R., Srinivasan, S. et Ravi, A.V. (2018). Inhibition of quorum sensing-mediated virulence in *Serratia marcescens* by *Bacillus subtilis* R-18. *Microb. Pathog.* *120*, 166–175.
- Dubnau, D. et Mirouze, N. (2013). Chance and Necessity in *Bacillus subtilis* Development. *Microbiol. Spectr.* 103–127.
- Egorshina, A.A., Khairullin, R.M., Sakhabutdinova, A.R. et Luk'yantsev, M.A. (2012). Involvement of phytohormones in the development of interaction between wheat seedlings and endophytic *Bacillus subtilis* strain 11BM. *Russ. J. Plant Physiol.* *59*, 148–154.
- Elsholz, A.K.W., Wacker, S.A. et Losick, R. (2014). Self-regulation of exopolysaccharide production in *Bacillus subtilis* by a tyrosine kinase. *Genes Dev.* *28*, 1710–1720.
- Epstein, A.K., Pokroy, B., Seminara, A. et Aizenberg, J. (2011). Bacterial biofilm shows persistent resistance to liquid wetting and gas penetration. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *108*, 995–1000.
- Fan, B., Wang, C., Song, X., Ding, X., Wu, L., Wu, H., Gao, X. et Borriss, R. (2018). *Bacillus velezensis* FZB42 in 2018: The gram-positive model strain for plant growth promotion and biocontrol. *Front. Microbiol.* *9*, 1–14.
- Fan, H., Zhang, Z., Li, Y., Zhang, X., Duan, Y. et Wang, Q. (2017). Biocontrol of Bacterial Fruit Blotch by *Bacillus subtilis* 9407 via Surfactin-Mediated Antibacterial Activity and Colonization. *Front. Microbiol.* *8*.
- Fierer, N. (2017). Embracing the unknown: Disentangling the complexities of the soil microbiome. *Nat. Rev. Microbiol.* *15*, 579–590.
- Flemming, H.C. et Wingender, J. (2010). The biofilm matrix. *Nat. Rev. Microbiol.* *8*, 623–633.
- Fujita, M., González-Pastor, J.E. et Losick, R. (2005). High- and Low-Threshold Genes in the Spo0A Regulon of *Bacillus subtilis*. *J. Bac* *187*, 1357–1368.
- González-Jaramillo, L.M., Aranda, F.J., Teruel, J.A., Villegas-Escobar, V. et Ortiz, A. (2017). Antimycotic activity of fengycin C biosurfactant and its interaction with phosphatidylcholine model membranes. *Colloids Surfaces B*

Biointerfaces 156, 114–122.

González-Pastor, J.E. (2011). Cannibalism: A social behavior in sporulating *Bacillus subtilis*. FEMS Microbiol. Rev. 35, 415–424.

González-Pastor, J.E., Hobbs, E.C. et Lisock, R. (2003). Cannibalism by Sporulating Bacteria. Science (80-. ). 301, 510–513.

Grau, R.R., Oña, P. De, Kunert, M., Leñini, C., Gallegos-monterrosa, R., Mhatre, E. et Vileta, D. (2015). A Duo of Potassium-Responsive Histidine Kinases Govern the Multicellular Destiny of *Bacillus subtilis*. MBio 6, e00581-15.

Gupta, P., Kumar, V., Usmani, Z., Rani, R., Chandra, A. et Gupta, V.K. (2020). Implications of plant growth promoting *Klebsiella* sp. CPSB4 and *Enterobacter* sp. CPSB49 in luxuriant growth of tomato plants under chromium stress. Chemosphere 240, 124944.

Habib, C., Yu, Y., Gozzi, K., Ching, C., Shemesh, M. et 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, e0179761.

Haichar, F. el Z., Santaella, C., Heulin, T. et Achouak, W. (2014). Root exudates mediated interactions belowground. Soil Biol. Biochem. 77, 69–80.

Hamon, M.A. et Lazazzera, B.A. (2001). The sporulation transcription factor Spo0A is required for biofilm development in *Bacillus subtilis*. Mol. Microbiol. 42, 1199–1209.

Hardoim, P.R., van Overbeek, L.S., Berg, G., Pirttilä, A.M., Compant, S., Campisano, A., Döring, M. et Sessitsch, A. (2015). The Hidden World within Plants: Ecological and Evolutionary Considerations for Defining Functioning of Microbial Endophytes. Microbiol. Mol. Biol. Rev. 79, 293–320.

Harshey, R.M. (2003). Bacterial Motility on a Surface: Many Ways to a Common Goal. Annu. Rev. Microbiol. 57, 249–273.

Hartmann, A., Rothballer, M. et Schmid, M. (2008). Lorenz Hiltner, a pioneer in rhizosphere microbial ecology and soil bacteriology research. Plant Soil 312, 7–14.

Harwood, C.R., Mouillon, J.M., Pohl, S. et Arnau, J. (2018). Secondary metabolite production and the safety of industrially important members of the *Bacillus subtilis* group. FEMS Microbiol. Rev. 42, 721–738.

Hiltner, L. (1904). Über neuere Erfahrungen und Probleme auf dem Gebiete der Bodenbakteriologie unter besonderer Berücksichtigung der Gründüngung und Brache. Arb. Der Dtsch. Landwirtsch. Gesel 98, 59–78.

Hinter, B. (2011). Use of Plant-Associated *Bacillus* Strains as Biofertilizers and Biocontrol Agents in Agriculture (Springer Berlin Heidelberg).

Hobley, L., Ostrowski, A., Rao, F. V., Bromley, K.M., Porter, M., Prescott, A.R., MacPhee, C.E., Van Aalten, D.M.F. et Stanley-Wall, N.R. (2013). BslA is a self-assembling bacterial hydrophobin that coats the *Bacillus subtilis* biofilm. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 110, 13600–13605.

Hu, L., Robert, C.A.M., Cadot, S., Zhang, X., Ye, M., Li, B., Manzo, D., Chervet, N., Steinger, T., Van Der Heijden, M.G.A., et al. (2018). Root exudate metabolites drive plant-soil feedbacks on growth and defense by shaping the rhizosphere microbiota. Nat. Commun. 9, 1–13.

Huang, Y., Wu, Z., He, Y., Ye, B.C. et Li, C. (2017). Rhizospheric *Bacillus subtilis* exhibits biocontrol effect against *Rhizoctonia solani* in pepper (*Capsicum annuum*). Biomed Res. Int. 2017.

- Igarashi, T. et Setlow, P. (2006). Transcription of the *Bacillus subtilis* gerK operon, which encodes a spore germinant receptor, and comparison with that of operons encoding other germinant receptors. *J. Bacteriol.* *188*, 4131–4136.
- Jiang, J., Gao, L., Bie, X., Lu, Z., Liu, H., Zhang, C., Lu, F. et Zhao, H. (2016). Identification of novel surfactin derivatives from NRPS modification of *Bacillus subtilis* and its antifungal activity against *Fusarium moniliforme*. *BMC Microbiol.* *16*, 31.
- Jones, D.L., Hodge, A. et Kuzyakov, Y. (2004). Plant and mycorrhizal regulation of rhizodeposition. *New Phytol.* *163*, 459–480.
- Kaspar, F., Neubauer, P. et Gimpel, M. (2019). Bioactive Secondary Metabolites from *Bacillus subtilis*: A Comprehensive Review. *J. Nat. Prod.* *82*, 2038–2053.
- Kearns, D.B. (2008). Division of labour during *Bacillus subtilis* biofilm formation. *Mol. Microbiol.* *67*, 229–231.
- Kearns, D.B. et Losick, R. (2003). Swarming motility in undomesticated *Bacillus subtilis*. *Mol. Microbiol.* *49*, 581–590.
- Kim, P. Il, Ryu, J., Kim, Y.H. et Chi, Y.T. (2010). Production of biosurfactant lipopeptides iturin A, fengycin, and surfactin A from *Bacillus subtilis* CMB32 for control of *Colletotrichum gloeosporioides*. *J. Microbiol. Biotechnol.* *20*, 138–145.
- Kinsella, K., Schulthess, C.P., Morris, T.F. et Stuart, J.D. (2009). Rapid quantification of *Bacillus subtilis* antibiotics in the rhizosphere. *Soil Biol. Biochem.* *41*, 374–379.
- Kinsinger, R.F., Shirk, M.C. et Fall, R. (2003). Rapid Surface Motility in *Bacillus subtilis* Is Dependent on Extracellular Surfactin and Potassium Ion. *J. Bacteriol.* *185*, 5627–5631.
- Kinsinger, R.F., Kearns, D.B., Hale, M. et Fall, R. (2005). Genetic requirements for potassium ion-dependent colony spreading in *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.* *187*, 8462–8469.
- Kobayashi, K. (2014). Plant methyl salicylate induces defense responses in the rhizobacterium *Bacillus subtilis*. *Environ. Microbiol.* *17*, 1365–1376.
- Kobayashi, K. et Iwano, M. (2012). BslA(YuaB) forms a hydrophobic layer on the surface of *Bacillus subtilis* biofilms. *Mol. Microbiol.* *85*, 51–66.
- Kohler, J., Caravaca, F., Carrasco, L. et Roldán, A. (2007). Interactions between a plant growth-promoting rhizobacterium, an AM fungus and a phosphate-solubilising fungus in the rhizosphere of *Lactuca sativa*. *Appl. Soil Ecol.* *35*, 480–487.
- Koo, B.-M., Kritikos, G., Farelli, J.D., Todor, H., Tong, K., Kimsey, H., Wapinski, I., Galardini, M., Cabal, A., Peters, J.M., et al. (2017). Construction and Analysis of Two Genome-Scale Deletion Libraries for *Bacillus subtilis*. *Cell Syst.* *4*, 291–305.
- Kraas, F.I., Helmetag, V., Wittmann, M., Strieker, M. et Marahiel, M.A. (2010). Functional dissection of surfactin synthetase initiation module reveals insights into the mechanism of lipoinitiation. *Chem. Biol.* *17*, 872–880.
- Kuan, K.B., Othman, R., Rahim, K.A. et Shamsuddin, Z.H. (2016). Plant growth-promoting rhizobacteria inoculation to enhance vegetative growth, nitrogen fixation and nitrogen remobilisation of maize under greenhouse conditions. *PLoS One* *11*.

- Lemanceau, P., Blouin, M., Muller, D. et Moëgne-Loccoz, Y. (2017). Let the Core Microbiota Be Functional. *Trends Plant Sci.* **22**, 583–595.
- López, D. et Kolter, R. (2010). Extracellular signals that define distinct and coexisting cell fates in *Bacillus subtilis*. *FEMS Microbiol. Rev.* **34**, 134–149.
- López, D., Vlamakis, H., Losick, R. et Kolter, R. (2009a). Paracrine signaling in a bacterium. *Genes Dev.* **23**, 1631–1638.
- López, D., Fischbach, M., Chu, F., Losick, R. et Kolter, R. (2009b). Structurally diverse natural products that cause potassium leakage trigger multicellularity in *Bacillus subtilis*. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **106**, 280–285.
- López, D., Vlamakis, H., Losick, R. et Kolter, R. (2009c). Cannibalism enhances biofilm development in *Bacillus subtilis*. *Mol. Microbiol.* **74**, 609–618.
- Lucy, M., Reed, E. et Glick, B.R. (2004). Applications of free living plant growth-promoting rhizobacteria. *Antonie Van Leeuwenhoek* **86**, 1–25.
- Luo, C., Zhou, H., Zou, J., Wang, X., Zhang, R., Xiang, Y. et Chen, Z. (2015). Bacillomycin L and surfactin contribute synergistically to the phenotypic features of *Bacillus subtilis* 916 and the biocontrol of rice sheath blight induced by *Rhizoctonia solani*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **99**, 1897–1910.
- McLoon, A.L., Kolodkin-Gal, I., Rubinstein, S.M., Kolter, R. et Losick, R. (2011). Spatial regulation of histidine kinases governing biofilm formation in *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.* **193**, 679–685.
- Meeske, A.J., Rodrigues, C.D.A., Brady, J., Lim, H.C., Bernhardt, T.G. et Rudner, D.Z. (2016). High-Throughput Genetic Screens Identify a Large and Diverse Collection of New Sporulation Genes in *Bacillus subtilis*. *PLoS Biol.* **14**.
- Mendes, R., Garbeva, P. et Raaijmakers, J.M. (2013). The rhizosphere microbiome: Significance of plant beneficial, plant pathogenic, and human pathogenic microorganisms. *FEMS Microbiol. Rev.* **37**, 634–663.
- Mielich-Süss, B. et Lopez, D. (2014). Molecular mechanisms involved in *Bacillus subtilis* biofilm formation. *Environ. Microbiol.* **17**, 555–565.
- Mofid, M.R., Finking, R., Essen, L.O. et Marahiel, M.A. (2004). Structure-Based Mutational Analysis of the 4'-Phosphopantetheinyl Transferases Sfp from *Bacillus subtilis*: Carrier Protein Recognition and Reaction Mechanism. *Biochemistry* **43**, 4128–4136.
- Mohite, B. (2013). Isolation and characterization of indole acetic acid (IAA) producing bacteria from rhizospheric soil and its effect on plant growth. *J. Soil Sci. Plant Nutr.* **13**, 638–649.
- Molina-Santiago, C., Pearson, J.R., Navarro, Y., Berlanga-Clavero, M.V., Caraballo-Rodriguez, A.M., Petras, D., García-Martín, M.L., Lamon, G., Haberstein, B., Cazorla, F.M., et al. (2019). The extracellular matrix protects *Bacillus subtilis* colonies from *Pseudomonas* invasion and modulates plant co-colonization. *Nat. Commun.* **10**, 1–15.
- Ongena, M. et Jacques, P. (2008). *Bacillus* lipopeptides: versatile weapons for plant disease biocontrol. *Trends Microbiol.* **16**, 115–125.
- Ongena, M., Jourdan, E., Adam, A., Paquot, M., Brans, A., Joris, B., Arpigny, J.L. et Thonart, P. (2007). Surfactin and fengycin lipopeptides of *Bacillus subtilis* as elicitors of induced systemic resistance in plants. *Environ. Microbiol.* **9**, 1084–1090.

- Van Oosten, M.J., Di Stasio, E., Cirillo, V., Silletti, S., Ventrino, V., Pepe, O., Raimondi, G. et Maggio, A. (2018). Root inoculation with *Azotobacter chroococcum* 76A enhances tomato plants adaptation to salt stress under low N conditions. *BMC Plant Biol.* *18*, 205.
- Oslizlo, A., Stefanic, P., Dogsa, I. et Mandic-Mulec, I. (2014). Private link between signal and response in *Bacillus subtilis* quorum sensing. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *111*, 1586–1591.
- Oslizlo, A., Stefanic, P., Vatovec, S., Beigot Glaser, S., Rupnik, M. et Mandic-Mulec, I. (2015). Exploring ComQXPA quorum-sensing diversity and biocontrol potential of *Bacillus* spp. isolates from tomato rhizoplane. *Microb. Biotechnol.* *8*, 527–540.
- Ostrowski, A., Mehert, A., Prescott, A., Kiley, T.B. et Stanley-Wall, N.R. (2011). YuaB functions synergistically with the exopolysaccharide and TasA amyloid fibers to allow biofilm formation by *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.* *193*, 4821–4831.
- Peralta, K.D., Araya, T., Valenzuela, S., Sossa, K., Martínez, M., Peña-Cortés, H. et Sanfuentes, E. (2012). Production of phytohormones, siderophores and population fluctuation of two root-promoting rhizobacteria in *Eucalyptus globulus* cuttings. *World J. Microbiol. Biotechnol.* *28*, 2003–2014.
- Pérez-García, A., Romero, D. et de Vicente, A. (2011). Plant protection and growth stimulation by microorganisms: Biotechnological applications of *Bacilli* in agriculture. *Curr. Opin. Biotechnol.* *22*, 187–193.
- Pertot, I., Puopolo, G., Hosni, T., Pedrotti, L., Jourdan, E. et Ongena, M. (2013). Limited impact of abiotic stress on surfactin production in planta and on disease resistance induced by *Bacillus amyloliquefaciens* S499 in tomato and bean. *FEMS Microbiol. Ecol.* *86*, 505–519.
- Pessotti, R.D.C., Hansen, B.L., Zacharia, V.M., Polyakov, D. et Traxler, M.F. (2019). High Spatial Resolution Imaging Mass Spectrometry Reveals Chemical Heterogeneity across Bacterial Microcolonies. *Anal. Chem.* *91*, 14818–14823.
- Philippot, L., Raaijmakers, J.M., Lemanceau, P. et Van Der Putten, W.H. (2013). Going back to the roots: The microbial ecology of the rhizosphere. *Nat. Rev. Microbiol.* *11*, 789–799.
- Quadri, L.E.N., Weinreb, P.H., Lei, M., Nakano, M.M., Zuber, P. et Walsh, C.T. (1998). Characterization of Sfp, a *Bacillus subtilis* phosphopantetheinyl transferase for peptidyl carboxyl protein domains in peptide synthetases. *Biochemistry* *37*, 1585–1595.
- Reinhold-Hurek, B., Bünker, W., Burbano, C.S., Sabale, M. et Hurek, T. (2015). Roots Shaping Their Microbiome: Global Hotspots for Microbial Activity. *Annu. Rev. Phytopathol.* *53*, 403–424.
- Romero, D., Aguilar, C., Losick, R. et Kolter, R. (2010). Amyloid fibers provide structural integrity to *Bacillus subtilis* biofilms. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *107*, 2230–2234.
- Romero, D., Vlamakis, H., Losick, R. et Kolter, R. (2011). An Accessory Protein Required for Anchoring and Assembly of Amyloid Fibers in *B. subtilis* Biofilms. *Mol. Microbiol.* *80*, 1155–1168.
- Rosenberg, G., Steinberg, N., Oppenheimer-Shaanan, Y., Olender, T., Doron, S., Ben-Ari, J., Sirota-Madi, A., Bloom-Ackermann, Z., etKolodkin-Gal, I. (2016). Not so simple, not so subtle: The interspecies competition between *Bacillus simplex* and *Bacillus subtilis* and its impact on the evolution of biofilms. *Npj Biofilms Microbiomes* *2*, 1–11.
- Rudrappa, T., Czymmek, K.J., Pare, P.W., Paré, P.W. et Bais, H.P. (2008). Root-Secreted Malic Acid Recruits

Beneficial Soil Bacteria. *Plant Physiol.* **148**, 1547–1556.

Rudrappa, T., Biedrzycki, M.L., Kunjeti, G., Donofrio, N.M. et Czymmek, K.J. (2010). The rhizobacterial elicitor acetoin induces systemic resistance in *Arabidopsis thaliana*. **3**, 130–138.

Ryu, C., Farag, M.A., Hu, C., Reddy, M.S., Kloepper, J.W. et Pare, P.W. (2004). Bacterial volatiles induced resistance in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* **134**, 1017–1026.

Sabarwal, A., Kumar, K. et Singh, R.P. (2018). Hazardous effects of chemical pesticides on human health—Cancer and other associated disorders. *Environ. Toxicol. Pharmacol.* **63**, 103–114.

Sapre, S., Gontia-Mishra, I. et Tiwari, S. (2018). *Klebsiella* sp. confers enhanced tolerance to salinity and plant growth promotion in oat seedlings (*Avena sativa*). *Microbiol. Res.* **206**, 25–32.

Schwarzer, D., Mootz, H.D., Linne, U. et Marahiel, M.A. (2002). Regeneration of misprimed nonribosomal peptide synthetases by type II thioesterases. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **99**, 14083–14088.

Seminara, A., Angelini, T.E., Wilking, J.N., Vlamakis, H., Ebrahim, S., Kolter, R., Weitz, D.A. et Brenner, M.P. (2012). Osmotic spreading of *Bacillus subtilis* biofilms driven by an extracellular matrix. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **109**, 1116–1121.

Seydlová, G. et Svobodová, J. (2008). Review of surfactin chemical properties and the potential biomedical applications. *Cent. Eur. J. Med.* **3**, 123–133.

Shank, E.A. et Kolter, R. (2011). Extracellular signaling and multicellularity in *Bacillus subtilis*. *Curr. Opin. Microbiol.* **14**, 741–747.

Sipahutar, M.K., Piapukiew, J. et Vangnai, A.S. (2018). Efficiency of the formulated plant-growth promoting *Pseudomonas fluorescens* MC46 inoculant on triclocarban treatment in soil and its effect on *Vigna radiata* growth and soil enzyme activities. *J. Hazard. Mater.* **344**, 883–892.

Stein, T. (2005). *Bacillus subtilis* antibiotics: Structures, syntheses and specific functions. *Mol. Microbiol.* **56**, 845–857.

Steller, S., Sokoll, A., Wilde, C., Bernhard, F., Franke, P. et Vater, J. (2004). Initiation of surfactin biosynthesis and the role of the SrfD-thioesterase protein. *Biochemistry* **43**, 11331–11343.

Stewart, K.A. V., Yi, X., Ghosh, S. et Setlow, P. (2012). Germination protein levels and rates of germination of spores of *Bacillus subtilis* with overexpressed or deleted genes encoding germination proteins. *J. Bacteriol.* **194**, 3156–3164.

Stragier, P., et Losick, R. (1996). Molecular genetics of sporulation in *Bacillus subtilis*. *Annu. Rev. Genet.* **30**, 297–341.

Straight, P.D., Fischbach, M.A., Walsh, C.T., Rudner, D.Z. et Kolter, R. (2007). A singular enzymatic megacomplex from *Bacillus subtilis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **104**, 305–310.

Tosato, V., Albertini, A.M., Zotti, M., Sonda, S. et Bruschi, C. V. (1997). Sequence completion, identification and definition of the fengycin operon in *Bacillus subtilis* 168. *Microbiology* **143**, 3443–3450.

Townsley, L., Yannarell, S.M., Huynh, T.N., Woodward, J.J. et Shank, E.A. (2018). Cyclic di-AMP acts as an extracellular signal that impacts *Bacillus subtilis* biofilm formation and plant attachment. *MBio* **9**, e00341-18.

- Tunsagool, P., Wang, X., Leelasuphakul, W., Jutidamrongphan, W., Phaonakrop, N., Jaresitthikunchai, J., Roytrakul, S., Chen, G. et Li, L. (2019). Metabolomic study of stress responses leading to plant resistance in mandarin fruit mediated by preventive applications of *Bacillus subtilis* cyclic lipopeptides. *Postharvest Biol. Technol.* *156*, 110946.
- Vandenkoornhuyse, P., Quaiser, A., Duhamel, M., Le Van, A. et Dufresne, A. (2015). The importance of the microbiome of the plant holobiont. *New Phytol.* *206*, 1196–1206.
- Vlamakis, H., Aguilar, C., Losick, R. et Kolter, R. (2008). Control of cell fate by the formation of an architecturally complex bacterial community. *Genes Dev.* *22*, 945–953.
- Vlamakis, H., Chai, Y., Beauregard, P., Losick, R. et Kolter, R. (2013). Sticking together: building a biofilm the *Bacillus subtilis* way. *Nat. Rev. Microbiol.* *11*, 157–168.
- Vollenbroich, D., Mehta, N., Zuber, P., Vater, J., et Kamp, R.M. (1994). Analysis of surfactin synthetase subunits in *srfA* mutants of *Bacillus subtilis* OKB105. *J. Bacteriol.* *176*, 395–400.
- Vorholt, J.A. (2012). Microbial life in the phyllosphere. *Nat. Rev. Microbiol.* *10*, 828–840.
- Werb, M., García, C.F., Bach, N.C., Grumbein, S., Sieber, S.A., Opitz, M. et Lieleg, O. (2017). Surface topology affects wetting behavior of *Bacillus subtilis* biofilms. *Npj Biofilms Microbiomes* *3*, 1–10.
- Weselowski, B., Nathoo, N., Eastman, A.W., MacDonald, J. et Yuan, Z.C. (2016). Isolation, identification and characterization of *Paenibacillus polymyxa* CR1 with potentials for biopesticide, biofertilization, biomass degradation and biofuel production. *BMC Microbiol.* *16*, 244.
- Wilking, J.N., Zaburdaev, V., De Volder, M., Losick, R., Brenner, M.P. et Weitz, D.A. (2013). Liquid transport facilitated by channels in *Bacillus subtilis* biofilms. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *110*, 848–852.
- Wu, Y., Zhao, C., Farmer, J. et Sun, J. (2015). Effects of bio-organic fertilizer on pepper growth and *Fusarium* wilt biocontrol. *Sci. Hortic. (Amsterdam)*. *193*, 114–120.
- Xie, S., Wu, H., Chen, L., Zang, H., Xie, Y. et Gao, X. (2015). Transcriptome profiling of *Bacillus subtilis* OKB105 in response to rice seedlings. *BMC Microbiol.* *15*, 21.
- Yan, F., Yu, Y., Wang, L., Luo, Y., Guo, J. et Chai, Y. (2016). The comER Gene Plays an Important Role in Biofilm Formation and Sporulation in both *Bacillus subtilis* and *Bacillus cereus*. *Front. Microbiol.* *7*, 1025.
- Yang, Y., Pollard, A.M., Höfler, C., Poschet, G., Wirtz, M., Hell, R. et Sourjik, V. (2015). Relation between chemotaxis and consumption of amino acids in bacteria. *Mol. Microbiol.* *96*, 1272–1282.
- Yasbin, R.E. et Young, F.E. (1974). Transduction in *Bacillus subtilis* by Bacteriophage SPP1. *J. Virol.* *14*, 1343–1348.
- Yuan, L., Zhang, S., Wang, Y., Li, Y., Wang, X. et Yang, Q. (2018). Surfactin Inhibits Membrane Fusion during Invasion of Epithelial Cells by Enveloped Viruses. *J. Virol.* *92*, e00809-18.
- Zerriouh, H., Romero, D., García-Gutiérrez, L., Cazorla, F.M., de Vicente, A. et Pérez-García, A. (2011). The Iturin-like Lipopeptides Are Essential Components in the Biological Control Arsenal of *Bacillus subtilis* Against Bacterial Diseases of *Cucurbits Houda*. *Mol. Plant-Microbe Interact.* *24*, 1540–1552.
- Zerriouh, H., de Vicente, A., Pérez-García, A. et Romero, D. (2014). Surfactin triggers biofilm formation of *Bacillus subtilis* in melon phylloplane and contributes to the biocontrol activity. *Environ. Microbiol.* *16*, 2196–2211.

Zhang, H., Kim, M.S., Krishnamachari, V., Payton, P., Sun, Y., Grimson, M., Farag, M.A., Ryu, C.M., Allen, R., Melo, I.S., et al. (2007). Rhizobacterial volatile emissions regulate auxin homeostasis and cell expansion in *Arabidopsis*. *Planta* 226, 839–851.

Zhang, H., Kim, M.S., Sun, Y., Dowd, S.E., Shi, H. et Paré, P.W. (2008). Soil bacteria confer plant salt tolerance by tissue-specific regulation of the sodium transporter HKT1. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 21, 737–744.

Zhou, C., Ge, N., Guo, J., Zhu, L., Ma, Z., Cheng, S. et Wang, J. (2019). *Enterobacter asburiae* Reduces Cadmium Toxicity in Maize Plants by Repressing Iron Uptake-Associated Pathways. *J. Agric. Food Chem.* 67, 10126–10136.

