

# **Sujet de thèse : Caractérisation d'une nouvelle forme de biofilm de *Bacillus subtilis* et application pour la stimulation de la croissance du blé**

## **Résumé**

Le projet de thèse visera à caractériser une nouvelle forme de biofilm de *Bacillus subtilis* récemment découverte par les chercheurs de l'UMRt BioEcoAgrom, *via* un modèle innovant de culture sous flux continu (*drip-flow biofilm reactor*). La caractérisation portera sur l'étude de la composition chimique du biofilm (nature des polymères impliqués), l'organisation cellulaire (étude par microscopie) ainsi que sur les gènes impliqués dans la fabrication et la destruction de ce nouveau type de biofilm. A l'aide de mutants capables et incapables de former ce biofilm, le doctorant étudiera également si ce biofilm constitue un avantage pour la souche pour des activités de colonisation des racines de blé et de biostimulation et de biocontrôle des maladies de cette culture.

## **1. Description du sujet (contexte scientifique, description du problème, Objectifs, .....) :**

*Bacillus sp.* est une bactérie utilisée en agriculture comme biostimulant (*Bacillus subtilis*) ou biopesticide (*Bacillus amyloliquefaciens* et *Bacillus velezensis*) depuis de nombreuses années (Anckaert et al.2021). Les résultats obtenus par les souches disponibles aujourd'hui sur le marché sont parfois mitigés. Pour stimuler la croissance des plantes ou les protéger contre des micro-organismes phytopathogènes, ces souches doivent en effet coloniser efficacement la rhizosphère et rentrer donc en compétition avec un microbiote bien adapté. Les souches capables de former un biofilm sont en général considérées comme potentiellement plus efficaces pour coloniser cette rhizosphère et notamment augmenter la résistance des plantes au stress hydrique (Lu et al., 2018). Le biofilm généré par les souches *Bacillus* dépend notamment de la capacité de la souche à produire un exopolysaccharide fabriqué notamment par le produit du gène *epsC* (Arbour et al., 2023). Des résultats obtenus récemment par des chercheurs de l'UMRt BioEcoAgro dans le cadre d'une collaboration entre l'Université Picardie Jules Verne et l'Université de Liège - utilisant un modèle de culture sous flux continu, *drip-flow biofilm reactor*- ont permis de mettre en évidence que des souches mutantes dérivées d'une souche *epsC*<sup>-</sup> et donc a priori incapables de produire un

biofilm étaient à nouveau capables de générer un biofilm de nature très probablement différente du biofilm classique.

### **Problématique**

La découverte récente de ce biofilm atypique chez un mutant *epsC*<sup>-</sup> de *B. subtilis* suggère l'existence de voies de biosynthèse alternatives. Ce biofilm pourrait conférer un avantage compétitif en conditions de stress, mais sa composition, sa régulation génétique et son impact agronomique nécessitent une exploration approfondie.

### **Les objectifs du projet de thèse visent :**

- A caractériser biochimiquement et physiologiquement ce nouveau biofilm
- A étudier comment il est généré ou dégradé
- A définir son impact sur les capacités de biostimulation de la croissance des plantes dans des conditions de stress hydrique.

### **2. Approche méthodologique :**

Le projet sera organisé en 4 work packages (WP) :

#### **a. Caractérisation biochimique de la matrice du biofilm**

Le WP1 visera à étudier et caractériser la nature des polymères et/ou métabolites qui forment la matrice. Ce travail sera principalement réalisé sur le site de l'UPJV dans l'équipe du Professeur François Mesnard. Un profilage métabolique sera notamment réalisé via une étude de type métabolomique non ciblée qui impliquera des analyses par Résonance Magnétique Nucléaire et par Spectrométrie de Masse (HRMS). Une analyse statistique multivariée sera effectuée. Les ensembles de données obtenus par RMN et LC-MS seront fusionnés et soumis à une analyse discriminante des moindres carrés partiels orthogonaux multiblocs (Multiblock OPLS-DA) afin d'explorer la variation totale des données. Les signaux des principaux métabolites seront identifiés à l'aide de la base de données du laboratoire.

Pour mettre en évidence la formation et destruction du biofilm, le « drip flow biofilm bioreactor » développé par Goeres et al. (2009) sera utilisé. Cet outil est utilisé dans l'UMRt BioEcoAgro depuis plusieurs années.

#### **b. Construction de souches et analyse de l'activité cellulaire**

Le WP2 visera à étudier par microscopie optique et à l'aide de souches construites avec des rapporteurs fluorescents quelle est l'activité des cellules présentes au sein de ce biofilm. Des souches mutantes et fluorescentes de *B. subtilis* 168 seront construites au Liban par l'équipe du Pr. Kassem Hamze et analysés en collaboration avec l'UPJV. Des fusions transcriptionnelles avec les gènes rapporteurs GFP (Green Fluorescent Protein) ou mKate (fluorescence rouge), déjà utilisés dans les travaux récents de l'équipe (Dergham et al., 2023), permettront d'étudier l'expression génique au sein du biofilm. La fluorescence sera observée en microscopie confocale pour analyser la distribution spatiale et l'activité cellulaire dans la matrice biofilm.

Chez l'UMRt BioEcoAgro une collection de 3984 mutants délétés dans les différents gènes non essentiels (Addgene) de *Bacillus subtilis* 168 sera utilisée pour identifier les gènes responsables de la fabrication et de la destruction du biofilm. La technique CRISPR Cas9 sera exploitée pour générer des délétions multiples.

#### **c. Analyse transcriptomique**

Dans le WP3, les équipes libanaises et française collaboreront pour mettre en place des études globales visant à identifier les voies de signalisation et les régulations impliquées dans la formation du biofilm alternatif. D'une part, des études transcriptomiques viseront à définir les gènes qui sont surexprimés ou réprimés dans les conditions de fabrication de ce nouveau type de biofilm. Des analyses RT-qPCR et éventuellement RNA-seq permettront de déterminer les gènes surexprimés ou réprimés chez les souches mutantes, par rapport à la souche control. D'autre part, des études métabolomiques - du type de celles développées dans le WP1 pour la caractérisation des constituants du biofilm - seront utilisées pour comparer les phénotypes biochimiques de souches produisant le biofilm classique ou le nouveau biofilm.

#### d. Expériences de colonisation de la rhizosphère

Dans le WP4, des souches productrices et non-productrices de biofilm seront testés à l'UPJV pour leur capacité à coloniser la rhizosphère de plants de blé et protéger les plantes contre un stress hydrique, voire des pathogènes.

#### 3. Résultats attendus :

- Détermination des composants biochimiques du nouveau biofilm
- Organisation cellulaire : Observation en fluorescence et caractérisation morphologique et phénotypique du biofilm
- Mécanisme de biosynthèse et de dégradation du biofilm : Mise en évidence des voies de biosynthèse et des régulations spécifiques associées à sa formation
- Impact sur la croissance du blé en conditions de stress hydrique, voire en présence de pathogène.

#### 4. Bibliographie :

1. Arbour, C. A., *et al.* (2023). *mBio*, \*14\*(5), e00948-23. <https://doi.org/10.1128/mbio.00948-23>
2. Lu, X., *et al.* (2018). *International Journal of Molecular Sciences*, \*19\*(12), 3795. <https://doi.org/10.3390/ijms19123795>
3. Goeres, D. M., *et al.* (2009). *Nature Protocols*, \*4\*(5), 783–788. <https://doi.org/10.1038/nprot.2009.59>
4. Dergham, Y., *et al.* (2023). *Nature Communications*, \*14\*(1), 7546. <https://doi.org/10.1038/s41467-023-43386-w>
5. Anckaert, A., *et al.* (2021). Dans *Biological Control of Plant Diseases* (pp. 123–145). Burleigh Dodds Science Publishing. <https://doi.org/10.19103/AS.2021.0093.10>