



AVERTISSEMENT

Ce document est le fruit d'un long travail approuvé par le jury de soutenance et mis à disposition de l'ensemble de la communauté universitaire élargie.

Il est soumis à la propriété intellectuelle de l'auteur. Ceci implique une obligation de citation et de référencement lors de l'utilisation de ce document.

D'autre part, toute contrefaçon, plagiat, reproduction illicite encourt une poursuite pénale.

Contact : ddoc-theses-contact@univ-lorraine.fr

LIENS

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 122. 4

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 335.2- L 335.10

http://www.cfcopies.com/V2/leg/leg_droi.php

<http://www.culture.gouv.fr/culture/infos-pratiques/droits/protection.htm>

Présentée et soutenue publiquement pour l'obtention du grade de DOCTEUR DE
L'UNIVERSITÉ DE LORRAINE en Biologie Végétale et Forestière par :

Cora Miquel-Guennoc

Le 6 mars 2017

Étude de l'interaction physique entre le champignon
ectomycorhizien *Laccaria bicolor* S238N et la
bactérie auxiliaire de la mycorhization
Pseudomonas fluorescens BBc6



U.S. DEPARTMENT OF
ENERGY



JURY

Rapporteurs

Mme Berge Odile

Chargée de recherche, HDR

INRA, Avignon

M. Sarniguet Alain

Directeur de recherche, HDR

INRA, Rennes

Examineurs

M. Aigle Bertrand

Professeur des universités, HDR

Université de Lorraine, Nancy

Mme Deveau Aurélie¹

Chargée de recherche

INRA, Nancy

Membres invités

M. Martin Francis²

Directeur de recherche, HDR

INRA, Nancy

Mme Frey-Klett Pascale

Directeur de recherche, HDR

INRA, Nancy

Laboratoire Interactions Arbres/Micro-organismes, UMR 1136, INRA, Nancy

1. Co-directrice de thèse

2. Directeur de thèse

*“Une raison, à jeun de science et de sagesse,
maigrit. Plaignons, à l’égal des estomacs, les
esprits qui ne mangent pas. S’il y a quelque
chose de plus poignant qu’un corps agonisant
faute de pain, c’est une âme qui meurt de la
faim de la lumière.”*

– Victor Hugo, Les Misérables, 1862

Remerciements

Je tiens tout d'abord à remercier mon directeur de thèse, Francis Martin pour m'avoir offert l'opportunité de réaliser cette thèse et plus particulièrement ma co-directrice Aurélie Deveau pour son encadrement et ses conseils avisés tout au long de cette aventure.

Je souhaite également remercier toutes les personnes qui m'ont accompagné et soutenu durant ces trois années : Pour commencer, mes trois compères avec qui j'ai tissé des liens d'amitié qui ne sont pas près de s'effiloche. Laurette ma « plus que collègue :) », ma plus grande confidente, joueuse invétérée qui a réussi à me mettre dans la peau d'un bonhomme de neige le temps d'une soirée. Béa la super Nana avec qui j'ai partagé mon amour de l'ail et de la chanson française, femme d'exception d'une franchise rare, aux talents de trompette buccale extraordinaires. Enfin, Fred et sa bonne (ou mauvaise) humeur communicative, ses « envies de dire », sa latéralité ambiguë et sa peur psychotique des punaises. Tous les trois, sachez que je vous aime et que ces trois années auraient été bien ternes sans les couleurs que vous y avez mises. Et, il y a Thibaut, mon camarade, mon compère de pogo, mon petit frère de cœur, qui sait que les petits animaux dansent dans la nuit. Il y a aussi Yohann, toujours plein de bonne humeur et de plaisirs gustatifs, aux pas de danse fantastiques, avec qui ce fût une joie de partager un bureau. Puis, il y a Clément et ses images explicites et drôles ainsi que ses conseils scientifiques de qualité, Jean Loulou avec son savoir faire et ses outils, Monsieur Lu et les bons moments passés ensemble à observer l'infiniment petit et enfin Patrice le révolutionnaire aux ongles acérés. Je remercie aussi tous ceux que je n'ai pas cité mais qui m'ont aidé dans la réalisation de cette thèse, ainsi que tous ceux avec qui j'ai simplement pu discuter, rire et partager. Merci également à mon Jojo, le talentueux dessinateur anonyme qui m'a fait l'honneur d'illustrer la conclusion de cette thèse. Enfin, je tiens de tout mon cœur à remercier Igor, mon homme, mon mari, mon chéri, pour son aide et son soutien durant cette longue aventure et avec qui je suis impatiente d'affronter les prochains défis qui nous attendent.

Préambule

Cette thèse, qui s'intègre dans le cadre de l'obtention du grade de Docteur en Biologie Végétale et Forestière, a été réalisée en collaboration entre l'Institut National pour la Recherche Agronomique (INRA) de Nancy et l'Oak Ridge National Laboratory (ORNL) (Oak Ridge, TN, USA). Bien qu'il était prévu que les travaux de recherche de cette thèse soient réalisés au sein de ces deux laboratoires, l'ensemble des travaux présentés dans ce manuscrit a été réalisé au laboratoire de l'INRA en raison de problèmes administratifs ayant compromis ma venue à l'ORNL.

Le présent manuscrit, qui rend compte de l'ensemble des travaux réalisés au cours de cette thèse, est divisé en quatre parties. La première partie correspond à une synthèse bibliographique qui permet de placer le sujet de cette thèse dans son contexte scientifique, découlant sur ses objectifs. La seconde partie expose le développement des méthodes qui ont été nécessaires à la réalisation de cette étude et comprend une publication de méthodologie qui est parue dans le journal JovE. La troisième partie contient les résultats de l'étude. Elle commence par une publication qui est en cours de soumission au journal ISME et qui comprend les résultats majeurs obtenus durant cette thèse. Les chapitres suivants exposent des résultats complémentaires qui permettent d'approfondir ceux présentés dans la publication. La quatrième partie présente les conclusions et perspectives. Les résultats principaux y sont résumés et discutés, et des solutions sont proposées pour répondre aux questions qu'ils soulèvent. Enfin, à la fin du présent manuscrit figurent les références bibliographiques, le glossaire et la liste des acronymes utilisés, ainsi que les annexes qui contiennent les détails des protocoles utilisés (hormis ceux déjà décrits dans les publications).

Table des matières

I	État de l’art et contexte de l’étude	15
1	Les bactéries et les champignons dans les écosystèmes du sol	17
1.1	Abondance et fonctions écologiques des champignons et des bactéries du sol	17
1.2	Les types d’interactions existant entre les champignons et les bactéries du sol	20
1.2.1	Les interactions bénéfiques	20
1.2.2	Les interactions délétères	23
1.3	Interactions physiques entre champignons et bactéries	24
1.3.1	Généralités sur les biofilms bactériens	24
1.3.2	Les biofilms bactériens sur les hyphes des champignons du sol	27
2	Cas particuliers de la symbiose mycorhizienne	29
2.1	Les champignons mycorhiziens	29
2.1.1	Définition	29
2.1.2	Rôle écologique des ECM	32
2.2	Les bactéries auxiliaires de la mycorhization	32
2.3	<i>Pseudomonas fluorescens</i> BBc6 et <i>Laccaria bicolor</i> S238N	34
3	Objectifs de la thèse et démarche expérimentale	37

II	Méthodologies	39
4	Développement d'une méthode d'analyse qualitative de la formation de biofilms bactériens sur hyphes fongiques par microscopie confocale	41
4.1	Introduction	41
4.2	A New Method for Qualitative Multiscale Analysis of Bacterial Biofilms on Filamentous Fungal Colonies Using Confocal and Electron Microscopy	42
4.2.1	Video Link	43
4.2.2	Introduction	43
4.2.3	Protocol	45
4.2.4	Representative Results	50
4.2.5	Discussion	55
5	Mise au point d'une méthode quantitative d'analyse de la formation de biofilms bactériens sur hyphes fongiques	63
5.1	Introduction	63
5.1.1	Méthodes existantes pour l'analyse quantitative des biofilms	64
5.1.2	Stratégie adoptée pour la quantification des biofilms de BBc6 sur les hyphes de <i>L. bicolor</i>	67
5.2	Essais de deux approches indirectes pour la quantification de biofilms sur des hyphes	68
5.2.1	Description des protocoles testés	68
5.2.2	Résultats et discussion	68
5.3	Développement d'une méthode de quantification directe par microscopie	71
5.3.1	Description de la méthode employée	71
5.3.2	Résultats et discussion	73
5.4	Conclusions et perspectives concernant la quantification de biofilms formés sur hyphes	78

III	Résultats	81
6	Analyse générale qualitative de la formation de biofilms bactériens sur les champignons du sol	83
6.1	Introduction	83
6.2	Bacterial biofilm formation on soil fungi : a widespread ability under controls	84
6.2.1	Introduction	85
6.2.2	Material and methods	87
6.2.3	Results	91
6.2.4	Discussion	102
6.2.5	Conclusion & perspectives	107
6.3	Résultats complémentaires préliminaires	115
6.3.1	Pour aller plus loin avec les Ascomycètes	115
6.3.2	L'énigme des filaments d'ADN	117
7	Des facteurs trophiques influencent-ils la localisation des biofilms de BBc6 sur les colonies de <i>L. bicolor</i> ?	125
7.1	Introduction	125
7.2	section.7.2	
7.3	Lien entre facteurs trophiques et formation de biofilms	130
7.4	Conclusions et perspectives	138
8	Formation de biofilms et effet auxiliaire de la mycorhization	139
8.1	Introduction	139
8.1.1	Zoom sur le système de sécrétion de type III	141
8.1.2	Zoom sur la protéine MorA	144
8.2	Formation de biofilms par des mutants de BBc6R8 ayant perdu leur effet auxiliaire	144
8.2.1	Analyse de la formation de biofilms sur surface abiotique par la méthode de marquage au cristal violet	144
8.2.2	Analyse des biofilms formés sur les hyphes de <i>L. bicolor</i> par microscopie	148
8.3	Conclusions et perspectives	150

IV	Pour conclure	153
9	Conclusion générale et perspectives	155
9.1	Formation de biofilms par BBc6 sur les hyphes de <i>L. bicolor</i> . . .	155
9.2	Spécificité de l'interaction physique	161
9.3	Interactions trophiques entre BBc6 et <i>L. bicolor</i>	164
9.4	Les filaments d'ADN	167
9.5	Existe-t-il un lien entre l'effet auxiliaire de BBc6 et sa formation de biofilms?	170
9.6	Nécessité des études en sol	173
	Annexes	175
	Glossaire	184
	Acronymes	185
	Bibliographie	189

Table des figures

1.1	Les différents types d'interactions existant entre les bactéries et les champignons dans les sols	21
1.2	Séquence d'étapes constituant le processus dynamique de la formation de biofilms bactériens	25
2.1	Mycorhize formée par l'ECM <i>Cenococcum geophilum</i> avec le Peuplier.	30
2.2	Modèle théorique de l'interaction entre BBc6 et <i>L. bicolor</i>	36
4.1	Overall schematic procedure of fungal culture and biofilm preparation.	51
4.2	BBc6 biofilms repartition on the fungal colony.	52
4.3	Early and late stages of BBc6 biofilm formation on <i>L. bicolor</i> hyphae.	53
4.4	Matrix staining of BBc6 biofilm on <i>L. bicolor</i> hyphae.	54
4.5	SEM imaging of BBc6 biofilms on <i>L. bicolor</i> hyphae.	54
5.1	Test de quantification des biofilms par dénombrement d'UFC et PCRq	69
5.2	Test de la méthode de quantification automatique	74
5.3	Courbe de répartition des volumes des objets détectés après la segmentation de l'image	75
5.4	Courbe de répartitions des volumes des objets détectés sans les artefacts	77
6.1	Time course of BBc6 biofilm formation on <i>L. bicolor</i> hyphae <i>in vitro</i>	92
6.2	BBc6 biofilm matrix of 16 h-old biofilms as observed by confocal and electron microscopy	93
6.3	BBc6 biofilms in <i>in vitro</i> <i>L. bicolor</i> - <i>Populus</i> roots symbiotic system	95
6.4	Specificity of BBc6/ <i>L. bicolor</i> <i>in vitro</i> interaction	97
6.5	DNA-containing networks in bacterial biofilm matrices.	100
6.6	Theoretical ecological model of bacterial/fungal physical interactions in forest soils.	105

TABLE DES FIGURES

6.7	(fig. S1) Protocole for BBc6 biofilm formation on <i>L. bicolor</i> / <i>Populus</i> mycorrhizal system.	108
6.8	(fig. S2) SEM elemental map of filaments observed in BBc6 biofilms.	109
6.9	Test de la formation de biofilms de BBc6 sur <i>T. magnatum</i>	116
6.10	Formation de biofilms par BBc6 sur <i>T. melanosporum</i> préalablement tué par congélation.	116
6.11	Formation de biofilms par BBc6 sur <i>M. variabilis</i>	118
6.12	Répartition phylogénétique des souches fongiques testées	118
6.13	Zoom de la figure 6.13 où sont visibles des bactéries marquées par le WGA.	120
6.14	Biofilms de BBc6 après des traitements chimiques et physiques.	120
6.15	Filaments formés par BBc6 entre deux fibres de verre.	123
7.1	Expérience mise en place pour détecter un effet éventuel de <i>L. bicolor</i> sur la croissance de BBc6R8.	127
7.2	Effet de <i>L. bicolor</i> sur la croissance de BBc6R8.	127
7.3	Expérience mise en place pour tester la capacité de BBc6R8 à utiliser les hyphes de <i>L. bicolor</i> pour migrer dans le sol	129
7.4	Biofilms de BBc6 sur des colonies de <i>L. bicolor</i> tuées par déshydratation à l'éthanol.	132
7.5	Structures visibles sur les hyphes de <i>L. bicolor</i> tués par déshydratation à l'éthanol.	133
7.6	Hétérogénéité des biofilms de BBc6 sur fibres de verre.	136
7.7	Formation de biofilms par BBc6 sur une membrane de nylon.	137
8.1	Effet de BBc6R8 et de ses mutants sur le taux de mycorhization de <i>L. bicolor</i>	140
8.2	Système de sécrétion de type III	143
8.3	Domaines de la protéine MorA de BBc6	143
8.4	Formation de biofilms sur surface abiotique par la souche BBc6R8 et certains de ses mutants.	146
8.5	Analyse par microscopie confocale des biofilms formés par BBc6 et ses mutants sur les hyphes de <i>L. bicolor</i>	149

9.1	Modèle théorique de la dynamique de la formation de biofilms par BBc6 sur les hyphes de <i>L. bicolor</i>	157
9.2	Différents types d'interactions physiques observés entre BBc6 et les espèces fongiques testées.	162
9.3	Il peut être préférable qu'avec le gîte soit fournit le couvert! . . .	166
9.4	Spider bacteria.	169
9.5	BAM service : effet auxiliaire en échange d'une surface.	172

Première partie

État de l'art et contexte de l'étude

Chapitre 1

Les bactéries et les champignons dans les écosystèmes du sol

1.1 Abondance et fonctions écologiques des champignons et des bactéries du sol

Les sols se caractérisent par des propriétés physico-chimiques très variables (pH, granulométrie, concentration en eau et en nutriments...). Pour cette raison, dans le sol de nombreux environnements différents se côtoient, offrant une gamme d'habitats très variée pour les micro-organismes. Le sol constitue ainsi un des plus grand réservoir de diversité biologique (Dance 2008). Parmi ces micro-organismes, les champignons et les bactéries sont très abondants. Il a par exemple été estimé qu'un gramme de sol pouvait contenir jusqu'à 200 m d'hyphe fongiques (Van Der Heijden *et al.* 2008) et 10^8 à 10^{11} cellules bactériennes (Sikorski 2015). Ces organismes constituent des acteurs clés des cycles du carbone et des nutriments dans les sols, tels que l'azote et le phosphore, qui sont des éléments essentiels à la production des molécules du vivant tels que les acides nucléiques ou les protéines (Marschner et Rengel 2007). Ces micro-organismes peuvent par exemple augmenter la disponibilité de ces éléments dans les sols via la dégradation de la matière organique. En effet, les bactéries et les champignons saprotrophes sont capables de dégrader des molécules organiques complexes (eg. cellulose), qui sont inutilisables en l'état par les organismes supérieurs. Ainsi, via la dégradation de cette matière organique dite « récalcitrante », ces organismes vont produire de la matière organique de plus faible poids moléculaire et de la matière inorganique¹,

1. Lorsque le processus de dégradation de la matière organique aboutit à de la matière inorganique on parle de « minéralisation ».

facilement assimilables par les autres organismes du sol (Bender *et al.* 2016). Il a d'abord été pensé qu'au sein de ce processus de dégradation, les champignons étaient les principaux responsables de la dégradation de la matière la plus récalcitrante², les bactéries se chargeant de la dégradation de molécules plus simples provenant en partie de la dégradation effectuée en amont par les champignons. Cependant il est aujourd'hui admis que les bactéries participent elles aussi activement à la dégradation de la matière très récalcitrante (Pérez *et al.* 2002 ; Bugg *et al.* 2011 ; Tian *et al.* 2016). La capacité à dégrader la cellulose a par exemple été montrée pour de nombreuses souches bactériennes isolées du sol appartenant au Firmicutes, Actinobacteria, Proteobacteria et Bacteroidetes (López-Mondéjar *et al.* 2016). Outre son influence sur la disponibilité des nutriments dans le sol, la dégradation de la matière organique par les micro-organismes du sol contribue directement à l'enrichissement de l'atmosphère en dioxyde de carbone, ce gaz étant produit lors de la respiration microbienne (Gougoulias *et al.* 2014). Les bactéries du sol vont également influencer fortement le cycle global de l'azote, entre autre via la fixation biologique de l'azote atmosphérique qui est exclusivement réalisée par les procaryotes. Parmi les bactéries impliquées dans ce processus on retrouve des bactéries symbiotiques des plantes appartenant entre autres aux genres *Rhizobium* et *Frankia*, mais également des bactéries non symbiotiques, membres des *Bacillus*, *Clostridium*, *Azobacter* et *Klebsiella* (Hopkins et Dungait 2010). Un autre type d'activité microbienne influençant la disponibilité des nutriments dans les sols est la dissolution des minéraux via l'altération des roches. Encore une fois, cette activité a tout d'abord été attribuée principalement aux champignons, mais l'on sait aujourd'hui que les bactéries y participent activement (Uroz *et al.* 2011 ; Balogh-Brunstad *et al.* 2008). Cette dissolution des minéraux, réalisée par exemple via la production d'acides organiques et d'agents chélateurs (e.g sidérophore) par les bactéries et les champignons du sols, va contribuer à enrichir le sol en éléments minéraux essentiels³ à la fertilisation. Les bactéries et les champignons du sol vont également participer à la structuration de ce dernier en contribuant à la formation d'agrégats de particules de sol via notamment la production d'exopolysaccharides (Dorizio *et al.* 1993 ; Six *et al.* 2004). Ce phénomène participe à la séquestration

2. lignine, cellulose, hemi-cellulose...

3. Silicium, Aluminium, Fer, Magnésium, Calcium, Sodium, Potassium...

de certains éléments dans le sol, notamment du carbone (Condrón *et al.* 2010). Enfin, les micro-organismes du sol vont également avoir une influence directe sur la production végétale, positive ou négative. Ceux ayant une influence négative comprennent les pathogènes et les parasites des plantes (pour revue Talbot 2009). Ces derniers sont majoritairement des champignons⁴ et des Oomycètes⁵, mais ils comportent également certaines bactéries très connues telles que *Agrobacterium tumefaciens* et *Ralstonia solanacearum*. Outre leur influence négative directe sur la production végétale, ces organismes participent au fonctionnement des écosystèmes via la régulation des espèces végétales et l'apport de matière organique dû à la mort des végétaux infectés (Dixon et Tilston 2010). Parmi les micro-organismes influençant positivement la productivité végétale, on trouve les bactéries et les champignons symbiotiques⁶ des plantes. Concernant les bactéries, une des symbioses les plus répandues est celle réalisée par les bactéries du genre *Rhizobium*, qui forment des organes symbiotiques appelés nodules avec les racines des légumineuses, au sein desquelles les échanges nutritifs entre les partenaires vont avoir lieu. Ces bactéries fournissent à la plante de l'azote, grâce à leur capacité à fixer l'azote atmosphérique, et en retour la plante fournit aux bactéries de la matière carbonée (Ogle et Brown 1997). Les champignons symbiotiques des plantes sont quant à eux appelés champignons mycorhiziens et sont extrêmement répandus puisque la grande majorité des plantes terrestres vivent en associations symbiotiques avec ces derniers. Ce type de champignons sera décrit en détails dans le chapitre 2.

4. e.g *Fusarium oxysporum*, *Botrytis cinerea*, *Gaeumannomyces graminis*...

5. e.g *Phytophthora alni*, *Plasmopara viticola*, *Pythium ultimum*...

6. Le terme symbiose signifie « vivre ensemble ». Lors de son introduction en 1866 par Anton de Bary ce terme incluait le mutualisme, le commensalisme et le parasitisme. De nos jours, les notions de mutualisme et de symbiose sont le plus souvent confondues, l'emploi du terme symbiose dans ce manuscrit sous-entendra donc un effet positif mutuel.

1.2 Les types d'interactions existant entre les champignons et les bactéries du sol

La diversité des bactéries et des champignons dans les sols est très élevée, un seul gramme de sol pouvant contenir plusieurs milliers d'espèces fongiques et bactériennes (Schulz *et al.* 2006). Excepté dans les sol arctiques, où les Firmicutes sont le phylum dominant, les Proteobacteria représentent le phylum le plus abondant dans la plupart des sols (Mendes *et al.* 2013). Les Acidobacteria, Actinobacteria, Firmicutes et Bacteroidetes sont également souvent détectés en quantité importante (Uroz *et al.* 2010 ; Roesch *et al.* 2007 ; Weinert *et al.* 2011). Les phyla fongiques les plus abondants dans les sols sont généralement les Ascomycetes et les Basidiomycetes (Tedersoo *et al.* 2014 ; Buée *et al.* 2009 ; Kerfahi *et al.* 2014). En raison de leur diversité, et puisque qu'ils vont souvent partager leur habitat et utiliser les mêmes ressources, les bactéries et les champignons des sols vont interagir en permanence via une multitude de types d'interactions, bénéfiques ou néfastes (Frey-Klett *et al.* 2011 ; Kobayashi et Crouch 2009 ; Scherlach *et al.* 2013). Parmi ces interactions on trouve des interactions indirectes, où un organisme va avoir un effet sur un autre via la modification des propriétés physico-chimiques du milieu, mais également des interactions directes détaillées dans cette section et représentées en figure 1.1 .

1.2.1 Les interactions bénéfiques

Mutualisme et Commensalisme : Le mutualisme est une interaction à bénéfice réciproque. C'est par exemple le cas de l'interaction entre le champignon *Aspergillus niger* et la bactérie *Salmonella typhimurium* (Balbontin et Vlamakis 2014). Lors de cette interaction, la croissance de *S. typhimurium* est augmentée, probablement via l'utilisation de métabolites fongiques, et en retour, la colonisation bactérienne des hyphes de *A. niger* confère au champignon une résistance contre un composé toxique (cycloheximide). Parmi les interactions mutualistes, la coopération métabolique correspond à l'association de deux organismes pour la synthèse ou la dégradation d'un composé qu'ils ne pourraient pas prendre en

1.2. LES TYPES D'INTERACTIONS EXISTANT ENTRE LES CHAMPIGNONS ET LES BACTÉRIES DU SOL

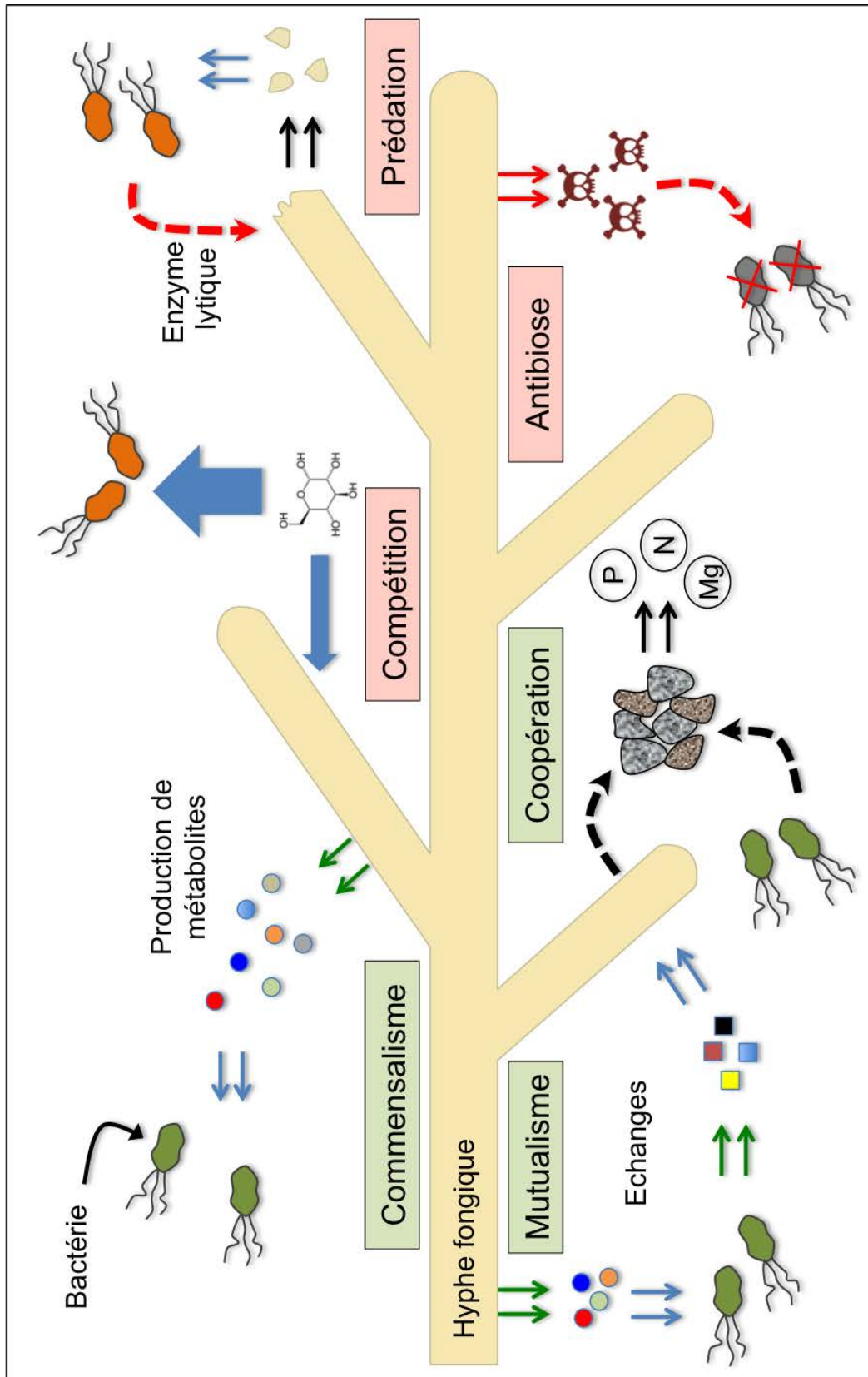


Figure 1.1 – Les différents types d'interactions existant entre les champignons et les bactéries dans les sols

charge individuellement. Dans les sols, une coopération métabolique entre *Stenotrophomonas maltophilia* et *Penicillium janthinellum* a par exemple été reportée pour la dégradation de composés aromatiques polycycliques de hauts poids moléculaires (Boonchan *et al.* 2000). Une coopération entre des bactéries et des champignons des sols a également été reportée concernant la dissolution des minéraux à partir des roches (Uroz *et al.* 2007). Le commensalisme quant à lui correspond à une interaction à bénéfice non réciproque. Un des partenaires va tirer profit de l'interaction sans aucun effet sur l'autre partenaire. Cependant, la réelle existence de ce type d'interaction est discutée puisque qu'il reste difficile d'affirmer qu'un organisme vivant à proximité d'un autre puisse n'avoir aucune influence sur ce dernier (Hastings et Gross 2012). Il est ainsi souvent considéré que les interactions commensales correspondent en fait à des interactions mutualistes ou parasites pour lesquels l'effet (positif ou négatif) sur le second partenaire n'a pas encore été détecté.

Transport : Dans les sols certains champignons filamenteux participent au transport de certaines bactéries. En effet, de part leur forme filamenteuse, les champignons sont particulièrement bien adaptés aux écosystèmes du sol car il peuvent ainsi parcourir de longues distances pour atteindre les éléments nutritifs, répartis de façon hétérogène dans les sols. Les bactéries en revanche sont limitées dans leur déplacement en raison de la présence de poches d'air entre les particules du sol. Les bactéries vont donc pouvoir se déplacer le long des hyphes pour atteindre les zones d'intérêt trophique (Wick *et al.* 2007; Pion *et al.* 2013b). Deux mécanismes impliqués dans le transport des bactéries par les hyphes fongiques ont été reportés : la présence d'une pellicule d'eau entourant les hyphes qui permet le déplacement actif des bactéries, et la formation de biofilms bactériens sur les hyphes en croissance qui induit un déplacement passif (Kohlmeier *et al.* 2005; Nazir *et al.* 2010). Ce transport bactérien par les hyphes peut s'inscrire dans une relation mutualiste. Il a par exemple été montré que durant la migration de la souche bactérienne *Burkholderia terrae* BS001 sur les hyphes de *Lyophyllum* sp., le champignon était plus résistant à l'action de différents antifongiques (Nazir *et al.* 2014). Un cas de transport mutuel a même été reporté dans le cas de *Paeni-*

bacillus vortex, qui permet le déplacement des conidies⁷ de *Aspergillus fumigatus* et utilisent les hyphes du champignon pour se déplacer (Ingham *et al.* 2011).

1.2.2 Les interactions délétères

Compétition : Cette interaction se produit lorsque des organismes exploitent une ressource commune, en quantité limitée. Elle est fréquente entre les champignons et les bactéries du sols qui sont en compétition notamment pour le carbone, l'azote et le fer (Frey-Klett *et al.* 2011). Ce type d'interaction est responsable de l'effet antagoniste de certaines souches bactériennes utilisées pour le bio-contrôle de certains pathogènes. C'est par exemple le cas de l'effet antagoniste de certaines souches de *Pseudomonas* sur le champignon phytopathogène *Fusarium oxysporum*, qui est fortement lié au fort pouvoir compétitif de ces bactéries vis-à-vis de la matière carbonée provenant des exsudats racinaires (Bolwerk *et al.* 2003).

Prédation : Concernant les organismes du sol, des cas de bactéries mycophages, qui produisent les enzymes nécessaires à la dégradation des parois fongiques, ont été reportés (De Boer *et al.* 2001 ; Chernin *et al.* 1995). Ces bactéries appartiennent principalement aux *Collimonas*, *Myxobacteria* et *Paenibacilli* (De Boer *et al.* 2005). A l'inverse, certains champignons sont capables de lyser et consommer des bactéries (Barron 1988) et il a même été suggéré que les bactéries constituent une source d'azote importante pour certains champignons saprotrophes (Barron 2003).

Antibiose : L'antibiose correspond à une interaction biologique dans laquelle un organisme subit l'effet délétère d'un composé produit par un autre organisme. Ce type d'interaction est très présent dans les sols, et joue un rôle important dans la sélection des organismes des différents écosystèmes de ce compartiment. Il a par exemple été montré que certaines espèces de champignons agaricoïdes produisent des antibiotiques capable d'inhiber la croissance des bactéries à Gram positif,

7. Spore assurant la multiplication asexuée des champignons et qui ne possède pas de mobilité autonome.

permettant la sélection des bactéries à Gram négatif dont les *Pseudomonas* (De Boer *et al.* 2005). Une observation similaire a été faite concernant le champignon *Coprinopsis cinerea* (Essig *et al.* 2014). L’antibiose est un mécanisme souvent impliqué dans l’antagonisme de souches bactériennes utilisées pour le bio-contrôle des pathogènes, comme par exemple les souches *Bacillus cereus* UW85 et *P. fluorescens* CHA0 qui produisent de multiples antibiotiques inhibant la croissance de plusieurs champignons pathogènes (Raaijmakers *et al.* 2002).

De nombreux types d’interactions existent donc entre les champignons et les bactéries du sol, et il est important de noter que ces interactions ne sont ni exclusives, ni statiques, puisque les interactions entre ces organismes peuvent se cumuler et varier selon les conditions du milieu ou l’état physiologique des participants.

1.3 Interactions physiques entre champignons et bactéries

Dans la majorité des cas, les interactions exposées précédemment nécessitent un certain degré de proximité spatiale entre les partenaires, qui dépendra souvent du pouvoir de diffusion des molécules impliquées. Dans certains cas, comme celui de la prédation ou du transport, une interaction physique peut même être requise. Même lorsqu’elle n’est pas nécessaire, l’interaction physique entre deux organismes peut amplifier leur interaction moléculaire car les molécules impliquées se retrouvent en concentration plus importante aux environs de leur producteur. On peut distinguer trois types d’interactions physiques entre les champignons et les bactéries : le simple attachement des bactéries sur les hyphes, la formation de biofilms bactériens autour des hyphes et la colonisation intracellulaire des hyphes. Nous allons ici nous intéresser plus particulièrement au cas des biofilms.

1.3.1 Généralités sur les biofilms bactériens

Les biofilms constituent le « mode de vie » dominant des bactéries, puisqu’il a été estimé que plus de 99 % de la biomasse bactérienne terrestre est sous forme de

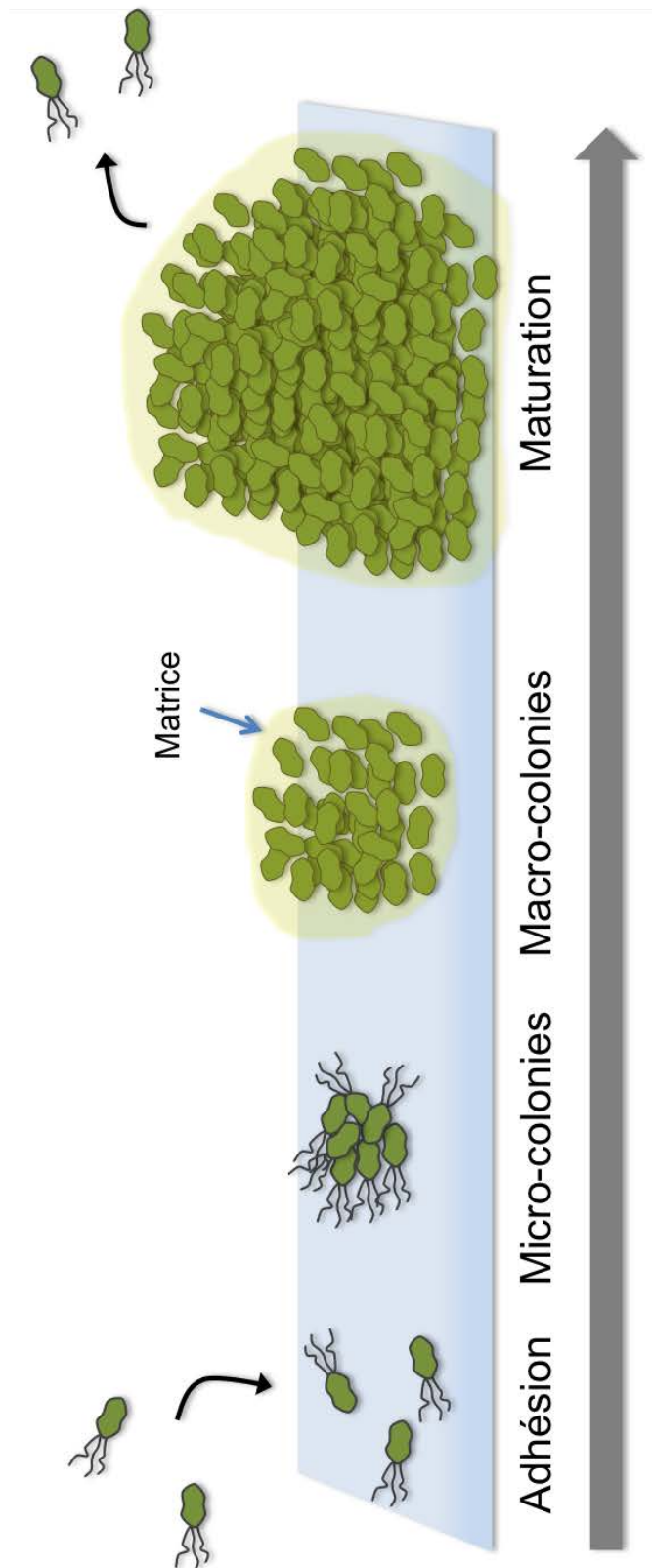


Figure 1.2 – Séquence d'étapes constituant le processus dynamique de la formation de biofilms bactériens

biofilms (Donlan 2002). Ils correspondent à des agrégats de cellules bactériennes attachés à une surface solide ou situés à une interface, et insérés au sein d’une matrice polymérique hydratée comprenant principalement des exopolysaccharides, des protéines, des lipides et de l’ADN extracellulaire (Flemming et Wingender 2010). La dominance de ce « mode de vie » peut s’expliquer par les nombreux avantages qu’il confère : résistance contre les antibiotiques et autres composés toxiques (Koechler *et al.* 2015) ; résistance contre la prédation (Nadell *et al.* 2015) ; résistance contre la dessiccation (Türetgen *et al.* 2007) ; organisation en communauté fonctionnelle (Jefferson 2004).

La formation d’un biofilm sur une surface est un processus dynamique comprenant les étapes clés suivantes (fig. 1.2).

1. Une étape d’adhésion tout d’abord réversible médiée par des interactions faibles⁸. Puis, une adhésion irréversible qui s’établit notamment via des structures bactériennes (e.g. pili, flagelles) et des exopolysaccharides.
2. Une étape de formation de micro-colonies via la croissance des bactéries attachées et l’agrégation de bactéries planctoniques.
3. Une étape de formation de macro-colonies lors de laquelle les bactéries synthétisent une matrice extracellulaire.
4. Une étape de maturation durant laquelle le biofilm s’épaissit et se structure.
5. Une étape de dispersion peut se produire, généralement lorsque les sources de nutriments deviennent limitées, permettant la colonisation de nouvelles surfaces.

Les mécanismes moléculaires impliqués dans la formation de biofilms varient beaucoup en fonction des espèces bactériennes (Dufour *et al.* 2012). Toutefois deux systèmes de signalisation semblent impliqués dans la formation de biofilms de nombreuses espèces bactériennes telles que *P. aeruginosa*, *P. putida*, *Xanthomonas campestris* ou encore *Burkholderia cenocepacia* (Fazli *et al.* 2014 ; Srivastava et Waters 2012). Cela concerne le di-GMP⁹, qui régule le passage de l’état mobile à l’état sessile via la stimulation de la production d’adhésines et l’inhibition de

8. Forces de van der Waals, forces électrostatiques et interactions stériques.

9. Diguanosine-5'-monophosphate cyclique, second messenger bactérien.

la formation de flagelles (Hengge 2009), et le « quorum sensing »¹⁰, qui régule la production de lectine et d'ADN extracellulaire (Fazli *et al.* 2014) et influence le taux de di-GMPc (Srivastava et Waters 2012).

1.3.2 Les biofilms bactériens sur les hyphes des champignons du sol

Dans le domaine médical, la formation de biofilms bactériens sur hyphes fongiques a été bien étudiée, notamment en ce qui concerne l'interaction entre les pathogènes de l'Homme que sont *Pseudomonas aeruginosa* et *Candida albicans*. Un lien a ainsi été montré entre la formation de biofilms par *P. aeruginosa* sur les hyphes de *C. albicans* et l'effet antagoniste de cette bactérie sur ce champignon (Hogan et Kolter 2002). De plus une certaine spécificité de l'interaction physique a été montrée. En effet, alors que *P. aeruginosa* est capable de s'attacher et de former des biofilms sur ce champignon lorsqu'il est sous sa forme filamenteuse, elle en est incapable lorsque qu'il est sous forme de levure (Hogan et Kolter 2002). De façon intéressante, une souche de *Staphylococcus epidermidis* est par contre capable de former des biofilms sur les deux formes de *C. albicans* (Adam *et al.* 2002). Bien que les résultats obtenus dans le domaine médical soulignent l'importance de la formation de biofilms dans certaines interactions moléculaires entre champignons et bactéries, moins d'études ont porté sur cet aspect en ce qui concerne les bactéries et les champignons des sols.

Dans les sols, les hyphes fongiques constituent des surfaces biotiques particulièrement favorables à la formation de biofilms, notamment en raison de la présence d'exsudats fongiques carbonés (Burmølle *et al.* 2012). Associés aux hyphes fongiques, ces biofilms bactériens peuvent s'inscrire dans une relation mutualiste avec le partenaire fongique en accélérant les processus de dissolution des minéraux (Balogh-Brunstad *et al.* 2008) ou ceux de la dégradation de polluants (Sarand *et al.* 1998), ou en protégeant les hyphes contre des composés antifongiques (Nazir *et al.* 2010). Il a par exemple été montré que la biodégradation de polyéthylènes

10. Système permettant aux bactéries de percevoir leur densité via la sécrétion et la perception d'auto-inducteurs.

par une souche bactérienne de *Bacillus mycoides* et par une souche fongique de *Penicillium frequentans*, était augmentée lorsque ces deux organismes étaient associés sous forme de biofilms (Seneviratne *et al.* 2006). A l'inverse, ces biofilms peuvent s'inscrire dans une relation délétère via par exemple la production de molécules toxiques. Ainsi, de la même façon que ce qui avait été observé pour *P. aeruginosa* et *C. albicans*, il semble que l'effet antagoniste de deux souches de *Pseudomonas* utilisées pour le bio-contrôle du champignon pytopathogène *Fusarium oxysporum*, soit lié à la formation de biofilms de ces bactéries sur les hyphes fongiques (Bolwerk *et al.* 2003). Il reste toutefois difficile d'étudier l'occurrence de ces phénomènes dans les sols car les manipulations nécessaires pour extraire les hyphes du sol sont susceptibles de décrocher les biofilms présents sur ces derniers. Pour cette raison la formation de biofilms bactériens sur les hyphes des champignons des sols a principalement été étudiée *in vitro*, le plus souvent dans un milieu liquide. Les résultats obtenus *in vitro* ont montré que beaucoup de bactéries sont capables de former des biofilms sur les hyphes de nombreux champignons (Hogan *et al.* 2007; Lee *et al.* 2013; Pliego *et al.* 2008; Balbontin et Vlamakis 2014). De plus, une étude a montré que la formation de biofilms bactériens pouvait être influencée par l'état physiologique des hyphes puisque plusieurs espèces bactériennes ont montré des taux de formation de biofilms différents entre des hyphes vivants et des hyphes morts de *Glomus intraradices* (Toljander *et al.* 2006). Enfin certains champignons semblent inhiber la formation de biofilms de certaines bactéries (Peres De Carvalho *et al.* 2015).

Chapitre 2

Cas particuliers de la symbiose mycorhizienne

2.1 Les champignons mycorhiziens

2.1.1 Définition

Au sein de la rhizosphère¹, les champignons mycorhiziens forment avec les racines des plantes des organes symbiotiques appelés mycorhizes. Le terme mycorhize a été introduit par Albert Bernhard Frank en 1885, et provient des mots grecs « mycos » qui veut dire champignon et « rhiza » qui veut dire racine. Ce terme décrit une interaction symbiotique mutualiste dans laquelle la plante, qui est autotrophe², fournit au champignon, qui est hétérotrophe³, de la matière carbonée sous forme de sucre. En retour, le champignon fournit à la plante des minéraux et de l'eau (Smith et Read 2008). Cette symbiose est la plus répandue et la plus ancienne des symbioses impliquant des plantes et des champignons et a probablement contribué à la colonisation du monde terrestre par les plantes (Brundrett 2002; Kohler *et al.* 2015). A ce jour, plus de 90 % des plantes terrestres sont en symbiose avec des champignons mycorhiziens (Wang et Qiu 2006), ces derniers ont donc une forte influence sur les écosystèmes (Cardon et Whitbeck 2007). Ces champignons appartiennent à deux groupes majeurs, les endomycorhiziens qui pénètrent à l'intérieur des cellules des racines et les ectomycorhiziens

1. Zone du sol à proximité immédiate des racines des plantes qui est sous l'influence de ces dernières.

2. Organisme capable de générer sa propre matière organique à partir d'éléments minéraux grâce à l'énergie lumineuse.

3. Organisme incapable de synthétiser lui-même sa matière organique et qui recourt donc à des sources exogènes.



Figure 2.1 – Mycorhize formée par l'ECM *Cenococcum geophilum* avec le Peuplier.

Cette image correspond à une coupe transversale d'une mycorhize et a été obtenue par projection 2D de coupes optiques obtenues par microscopie confocale au grossissement 40X. Les hyphes fongiques sont marqués au WGA 488 (en vert). Les cellules de la racine sont marquées à l'iodure de propidium (rouge) et présentent également de l'auto-fluorescence (bleu) qui est utilisée pour une meilleure visualisation, les cellules apparaissent donc en violet.

(ECM), qui pénètrent uniquement entre les cellules des racines. Seul le cas des ECM sera développé dans ce chapitre. Les ECM dominent les écosystèmes forestiers (Read 1991) et incluent plus de 7000 espèces appartenant aux Basidiomycètes et aux Ascomycètes. Ils s'associent en symbiose avec plus de 8000 espèces végétales, principalement des arbres, incluant les *Pinacea*, *Fagacea*, *Cistaceae* et *Dipterocarpaceae* (Taylor et Alexander 2005).

L'interaction entre les ECM et les racines des plantes implique la mise en place d'un « dialogue » moléculaire entre les deux partenaires et la régulation de l'expression de nombreux gènes chez ces derniers (Lagrange *et al.* 2001 ; Plett et Martin 2012 ; Le Quéré *et al.* 2005 ; Sebastiana *et al.* 2014). Ces modulations conduisent à la morphogenèse de l'organe symbiotique mixte, la mycorhize (fig. 2.1). Tout d'abord, les hyphes fongiques forment un « manteau » entourant les racines courtes de la plante, puis les hyphes pénètrent progressivement l'espace apoplastique⁴ des cellules racinaires (Taylor et Alexander 2005), pour former une structure appelée « réseau de Hartig » (Blasius *et al.* 1986). C'est à partir de ce dernier que se feront alors les échanges trophiques et la communication entre l'ECM et la plante (Peterson et Massicotte 2004).

En raison de la sécrétion de sucre par les hyphes fongiques, tels que le trehalose, le N-acetyl glucosamine et le mannitol (Martin *et al.* 1984), la mycorrhizosphère⁵ est fortement colonisée par de nombreuses espèces bactériennes (Uroz *et al.* 2007 ; Burke *et al.* 2008 ; Deveau *et al.* 2016b). Les communautés bactériennes présentes dans la mycorrhizosphere diffèrent de celles présentes dans le sol nu, un enrichissement de certaines espèces ou groupes fonctionnels ayant été observé. Il a par exemple été montré que l'ectomycorrhizosphère de *Scleroderma citrinum* associé au chêne (*Quercus petraea*) était enrichie en bactéries capables d'hydrolyser le glucopyranoside et la chitine (Uroz *et al.* 2013), ainsi qu'en bactéries ayant une forte activité de dissolution des minéraux telles que les *Burkholderia* (Calvaruso *et al.* 2010).

4. Espace correspondant à la zone extracellulaire formée par les parois pectocellulosiques et les zones vides entre les cellules végétales.

5. Zone au voisinage direct des racines mycorhizées et qui est donc à la fois sous l'influence des racines végétales et de celle des hyphes des champignons mycorhiziens.

2.1.2 Rôle écologique des ECM

Les ECM influencent les écosystèmes forestiers de multiples façons (pour revue voir Koide *et al.* (2014)). Ils vont par exemple promouvoir la croissance des arbres via :

- Une augmentation de la surface d'absorption des nutriments et de l'eau du sol grâce au mycelium extramatriciel qui fait office « d'extension racinaire » (Rousseau *et al.* 1994 ; Bucking *et al.* 2012).
- Une protection vis-à-vis de certains phytopathogènes (Mohan *et al.* 2015 ; Branzanti *et al.* 1999).
- Une augmentation de la disponibilité des nutriments dans les sols, particulièrement en ce qui concerne l'azote et le phosphore, via la dégradation de la matière organique et la dissolution des minéraux des roches (Phillips *et al.* 2013 ; Smith et Read 2008 ; Landeweert *et al.* 2001).

De plus, les ECM vont également influencer la composition des communautés bactériennes (Burke *et al.* 2006), la structure des sols (Zheng *et al.* 2014), et servent de sources nutritives pour les invertébrés (Setälä 1995). Enfin, les ECM ont également un intérêt économique direct puisque beaucoup d'entre eux sont comestibles (e.g. *Cantharellus cibarius*, *Boletus edulis*), dont certains avec une valeur marchande très élevée (e.g. *Tuber melanosporum*). De plus, les ECM ont également une importance économique dans le monde sylvicole via le processus de mycorhization contrôlée, utilisé dans les pépinières pour améliorer la production des plants (Le Tacon et Bouchard 1986).

2.2 Les bactéries auxiliaires de la mycorhization

Au début des années 90, Duponnois et Garbaye (1991) ont observé un effet positif de certaines bactéries du sol sur la mycorhization de certains ECM, ils ont donc introduit le concept de Bactéries Auxiliaires de la Mycorhization (BAM). Cet effet a par la suite été confirmé par de nombreuses études (Dunstan *et al.* 1998 ; Founoune *et al.* 2002 ; Aspray *et al.* 2006). Ces bactéries appartiennent à

de nombreuses espèces appartenant aux Protéobactérie, Firmicutes et Actinomy-cètes. L'effet de ces bactéries ne semble pas être spécifique d'espèces végétales particulières (Garbaye 1994 ; Duponnois et Plenchette 2003). L'effet de certaines BAM semble par contre être spécifique à des ECM particuliers (Duponnois et Garbaye 1991), tandis que d'autres sont capables de promouvoir la mycorhization de différents ECM (Duponnois et Plenchette 2003 ; Aspray *et al.* 2006).

Bien que les mécanismes impliqués dans les effets auxiliaires de ces bactéries sont encore mal connus, certains commencent à être élucidés. Le mécanisme le plus souvent reporté est la stimulation de la croissance radiale du mycelium pré-symbiotique (Riedlinger *et al.* 2006 ; Deveau *et al.* 2007). Parmi les autres mécanismes reportés, on trouve un effet sur le taux de ramification du mycelium (Deveau *et al.* 2007) ; une augmentation de la germination des spores fongiques⁶ (Xavier et Germida 2003 ; Hildebrandt *et al.* 2006) ; un effet sur la formation des racines latérale des plantes (Bending *et al.* 2002 ; Schrey *et al.* 2005) ; la suppression des défenses immunitaires de la plante (Lehr *et al.* 2007) ; la détoxification du sol (Brulé *et al.* 2001 ; Toljander *et al.* 2006) et enfin, un effet antagoniste contre certains pathogènes (Maier *et al.* 2004 ; Riedlinger *et al.* 2006). Les composantes moléculaires de ces effets sont pour la plupart inconnues puisqu'à ce jour les seuls métabolites bactériens identifiés comme étant impliqués dans les effets auxiliaires des BAM sont la thiamine⁷ et l'auxofurane⁸. L'auxofurane produit par la BAM *Streptomyces* sp. AcH 505 stimule la croissance de l'ECM *Amanita muscaria* (Riedlinger *et al.* 2006), et la thiamine produite par la BAM *Pseudomonas fluorescens* BBc6 stimule la croissance de l'ECM *L. bicolor* (Deveau *et al.* 2010). Enfin, une influence des BAM sur l'expression de certains gènes fongiques a été montrée pour *Streptomyces* sp. AcH 505, *Brevibacillus reuszeri* MPt17 et *P. fluorescens* BBc6, respectivement sur les ECM *A. muscaria*, *Pisolithus tinctorius* and *L. bicolor* (Schrey *et al.* 2005 ; Zhou *et al.* 2014 ; Deveau *et al.* 2007).

Le nombre important d'études portant sur l'effet des BAM sur les ECM a donc permis d'élucider certains des mécanismes impliqués dans l'effet auxiliaire de ces

6. Jusque là uniquement reporté pour les endomycorhiziens.

7. La thiamine, également appelée vitamine B1, est une vitamine essentielle, précurseur métabolique de la thiamine pyrophosphate (TPP), qui est une coenzyme de certaines décarboxylases.

8. L'auxofurane est une molécule de signalisation proche de l'auxine.

bactéries, en revanche l'effet des ECM sur les BAM a très peu été étudié. Il semble pourtant nécessaire d'examiner également cet aspect puisqu'il est probable que l'interaction entre ces organismes repose sur un bénéfice mutuel. Dans ce sens, il a d'ailleurs été montré que certains ECM pouvaient améliorer la croissance (Kurth *et al.* 2013) et la survie des BAM dans le sol (Frey-Klett *et al.* 1997 ; Deveau *et al.* 2010). Enfin, alors que de nombreux cas de biofilms bactériens formés sur des hyphes de champignons mycorhiziens ont été reportés (Toljander *et al.* 2006 ; Peres De Carvalho *et al.* 2015 ; Balogh-Brunstad *et al.* 2008), la formation de biofilms par des BAM sur ces champignons n'a pas été étudiée.

2.3 *Pseudomonas fluorescens* BBc6 et *Laccaria bicolor* S238N

Un des couples ECM/BAM les plus étudiés est le couple *Laccaria bicolor* S238N/*Pseudomonas fluorescens* BBc6, qui sont les organismes de référence de la présente thèse. *L. bicolor* S238N est un basidiomycète ectomycorhizien, qui a été isolé à partir d'un carpophore situé sous *Tsuga mertensiana*⁹. Son génome a été séquencé par Martin *et al.* (2008). *P. fluorescens* BBc6 est une bactérie à Gram négatif de type bacille, qui a été isolée d'un carpophore de *L. bicolor*, et dont la séquence génomique fut obtenue par Deveau *et al.* (2014a). De précédentes études nous ont permis d'élaborer un modèle théorique de leur interaction (fig. 2.2). Dans ce modèle, la production de métabolites par *L. bicolor* constitue la première étape de l'interaction, induisant un chimiotactisme de la bactérie. Pour l'heure, le seul métabolite identifié est le tréhalose, un disaccharide accumulé au niveau des hyphes de *L. bicolor* (Frey-Klett 1996 ; Deveau *et al.* 2010). Cependant, il est très probable que d'autres molécules soient impliquées dans ces mécanismes, dont l'identification nécessitera de plus amples recherches. BBc6 étant capable d'utiliser le tréhalose comme source de carbone, il est également suggéré que la sécrétion de ce sucre par *L. bicolor* favorise la croissance de la bactérie (Deveau *et al.* 2010). La seconde étape de ce modèle est la formation par BBc6 de structures similaires

9. Conifère d'Amérique du Nord appartenant à la famille des *Pinaceae*, également appelé Pruche subalpine

à des biofilms sur les hyphes de *L. bicolor*¹⁰ (Frey-Klett *et al.* 2007), couplée à la sécrétion de thiamine par la bactérie et probablement d'autres molécules non identifiées à ce jour. Ceci a pour effet d'augmenter la survie du champignon dans le sol ainsi que la croissance radiale et le nombre de ramifications du mycélium (Brulé *et al.* 2001 ; Deveau *et al.* 2007, 2010). Ces effets sont associés à une modification du transcriptome fongique (Deveau *et al.* 2007, 2014b). Il est ainsi suggéré qu'en augmentant la croissance du mycelium et son taux de survie dans le sol, la probabilité de rencontre avec des racines végétales est elle aussi augmentée, favorisant la mycorhization.

10. Phénomène observé *in vitro*

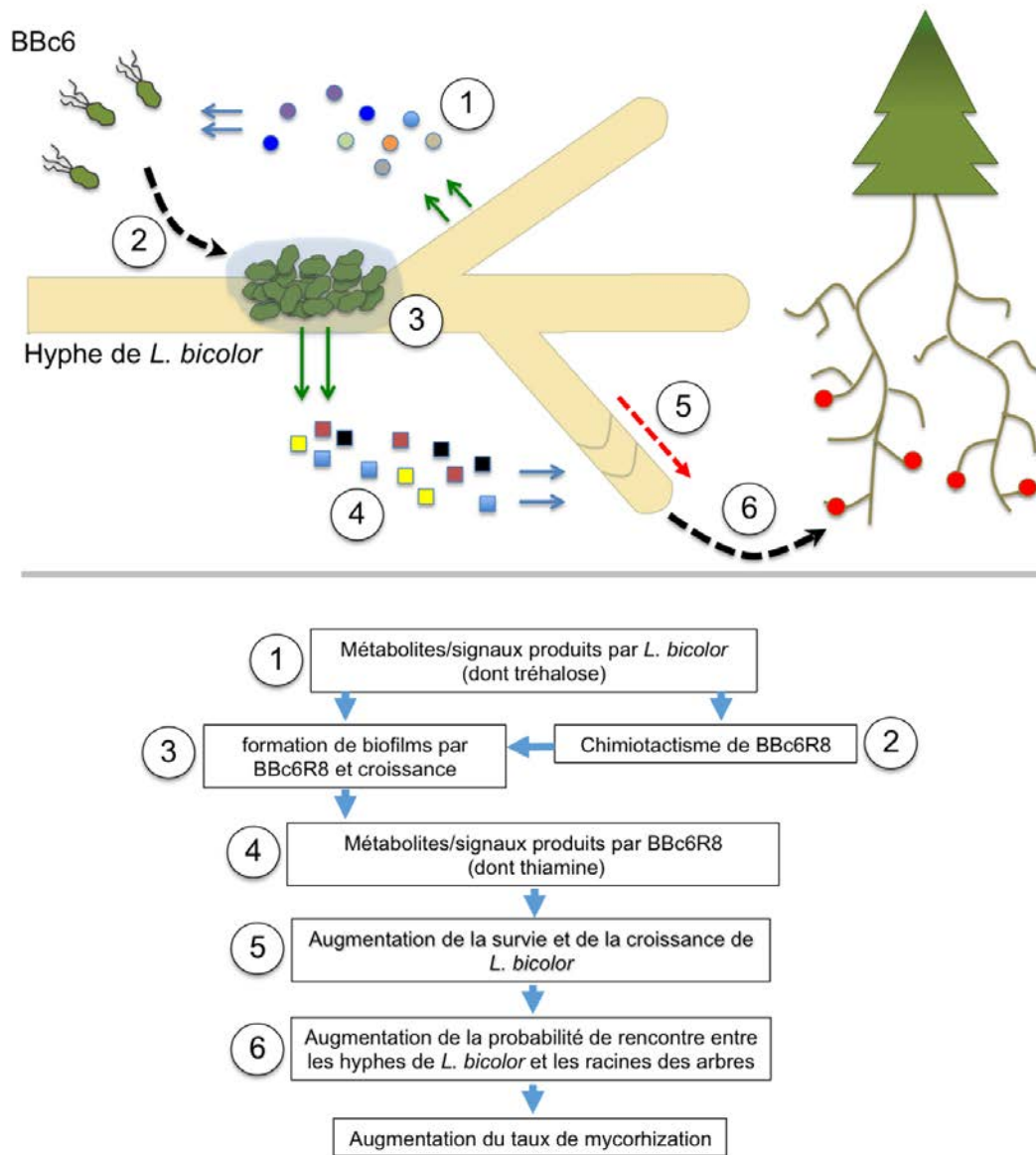


Figure 2.2 – Modèle théorique de l'interaction entre BBc6 et *L. bicolor*

Chapitre 3

Objectifs de la thèse et démarche expérimentale

Bien qu’une association physique entre des bactéries du sol et des hyphes de champignons mycorhiziens a souvent été reportée (Balogh-Brunstad *et al.* 2008 ; Nurmiaho-Lassila *et al.* 1997 ; Peres De Carvalho *et al.* 2015 ; Scheublin *et al.* 2010), aucune étude n’a à ce jour été réalisée concernant l’interaction physique entre des BAM et leurs ECM associés. Pourtant, il a été montré que l’interaction physique entre certains champignons et certaines bactéries pouvait être impliquée dans leurs interactions moléculaires (cf. chapitre 1). L’étude de l’interaction physique entre BAM et ECM pourrait donc permettre une meilleure compréhension des mécanismes impliqués dans l’effet auxiliaire de ces BAM. L’objectif de cette thèse était donc d’enrichir les connaissances concernant l’interaction entre les BAM et les ECM en se focalisant sur leurs interactions physiques. Puisqu’il a été montré en amont de cette thèse que la BAM BBc6 formait des structures similaires à des biofilms sur les hyphes de l’ECM *L. bicolor* (Frey-Klett *et al.* 2007) pendant leur interaction *in vitro*, ces organismes ont été utilisés comme organismes de référence pour cette étude. Les objectifs étaient les suivants :

1. Caractérisation des « biofilms » formés par BBc6 sur les hyphes de *L. bicolor* (cinétique de formation, présence d’une matrice, localisation sur la colonie fongique).
2. Étude de la spécificité de l’interaction physique entre *L. bicolor* et BBc6 via l’utilisation d’autres souches bactériennes et fongiques.
3. Étude de la possibilité d’un lien entre effet auxiliaire et formation de biofilms via l’analyse de la formation de biofilms sur surface abiotique par des mutants de BBc6 ayant perdu leur effet auxiliaire.

La microscopie confocale permettant l'analyse tridimensionnelle de biofilms hydratés, cette méthode a été choisie pour la réalisation des objectifs 1 et 2. Cependant, bien que cette technique soit facilement applicable pour l'analyse de biofilms sur des surfaces abiotiques, son application est plus délicate pour l'analyse de biofilms formés sur des colonies fongiques en raison de l'épaisseur du réseau d'hyphes. La première étape de cette thèse a donc été l'élaboration de protocoles pour l'analyse qualitative et quantitative de biofilms bactériens formés sur des colonies fongiques, présentée en partie II de ce manuscrit.

Remarque : Pour cette étude deux souches différentes de *P. fluorescence* BBc6 ont été utilisées : 1) La souche BBc6R8 qui correspond à un mutant spontané résistant à la rifampicine de la souche d'origine BBc6, 2) la souche BBc6-gfp qui correspond à une version de la souche d'origine transformée pour produire de la GFP. L'ensemble des analyses par microscopie a été réalisé avec la souche BBc6-gfp, tandis que les autres types d'analyses ont été réalisés avec la souches BBc6R8.

Deuxième partie

Méthodologies

Chapitre 4

Développement d'une méthode d'analyse qualitative de la formation de biofilms bactériens sur hyphes fongiques par microscopie confocale

4.1 Introduction

En permettant l'analyse tridimensionnelle de biofilms hydratés, la microscopie confocale a révolutionné l'étude des biofilms depuis les années 90. De nos jours, le développement d'une large gamme de marqueurs fluorescents spécifiques rend cette méthode encore plus attractive. Cependant, si elle a été largement appliquée à l'étude de biofilms formés sur des surfaces abiotiques, cette méthode peut être délicate à appliquer sur des biofilms formés sur des champignons filamenteux tel que *L. bicolor*. En effet, pour se développer ces champignons forment des réseaux d'hyphes épais, or les échantillons épais sont proscrits en microscopie confocale car cela limiterait la pénétration du laser. Afin d'étudier la formation de biofilms par BBc6 sur les hyphes de *L. bicolor* il a donc fallu développer une méthode. Celle-ci a donné lieu à une publication parue dans le journal JoVE qui est présentée dans ce chapitre. Une vidéo détaillée du protocole est également visible sur le site du journal¹.

1. <http://www.jove.com/video/54771>

4.2 A New Method for Qualitative Multiscale Analysis of Bacterial Biofilms on Filamentous Fungal Colonies Using Confocal and Electron Microscopy

Cora Miquel Guennoc^{1, 2}, Christophe Rose³, Frédéric Guinnet¹, Igor Miquel¹,
Jessy Labbé^{*2}, Aurélie Deveau^{*1}

¹Interactions Arbres – Microorganismes, UMR1136, INRA Université de Lorraine

²Biosciences Division, Oak Ridge National Laboratory

³Ecologie et Ecophysiologie Forestières - PTEF, UMR 1137, INRA Université de Lorraine

*These authors contributed equally

Correspondence to : Aurélie Deveau at aurelie.deveau@inra.fr

URL : <http://www.jove.com/video/54771>

DOI : doi:10.3791/54771

Keywords : Biofilm, fungal-bacterial interaction, matrix, multiscale, confocal microscopy, scanning electron microscopy

Date Published : 12/6/2016

Citation : Miquel Guennoc, C., Rose, C., Guinnet, F., Miquel, I., Labbé, J., Deveau, A. A New Method for Qualitative Multiscale Analysis of Bacterial Biofilms on Filamentous Fungal Colonies Using Confocal and Electron Microscopy. *J. Vis. Exp.* (), e54771, doi :10.3791/54771 (2016).

Abstract

Bacterial biofilms frequently form on fungal surfaces and can be involved in numerous bacterial-fungal interaction processes, such as metabolic cooperation, competition, or predation. The study of biofilms is important in many biological fields, including environmental science, food production, and medicine. However, few studies have focused on such bacterial biofilms, partially due to the difficulty of investigating them. Most of the methods for qualitative and quantitative biofilm analyses described in the literature are only suitable for biofilms forming on abiotic surfaces or on homogeneous and thin biotic surfaces, such as a monolayer of epithelial cells.

While laser scanning confocal microscopy (LSCM) is often used to analyze *in situ* and *in vivo* biofilms, this technology becomes very challenging when applied to

bacterial biofilms on fungal hyphae, due to the thickness and the three dimensions of the hyphal networks. To overcome this shortcoming, we developed a protocol combining microscopy with a method to limit the accumulation of hyphal layers in fungal colonies. Using this method, we were able to investigate the development of bacterial biofilms on fungal hyphae at multiple scales using both LSCM and scanning electron microscopy (SEM). This report describes the protocol, including microorganism cultures, bacterial biofilm formation conditions, biofilm staining, and LSCM and SEM visualizations.

4.2.1 Video Link

The video component of this article can be found at <http://www.jove.com/video/54771/>

4.2.2 Introduction

Fungi and bacteria have many opportunities to interact with each other because they cohabit in most terrestrial environments. Due to their diversity and their ubiquity, these interactions are important in many biological fields, including biotechnology, agriculture, food processing, and medicine^{1,2}. Molecular interactions require a certain degree of proximity to allow exchanges between the partners, and in some cases, a physical association of the partners is necessary for a functional interaction³. A common physical association between bacteria and fungi is the formation of bacterial biofilms on fungal surfaces⁴. This direct contact between bacterial cells and fungal hyphae permits intimate interactions that are involved in various biological processes. For example, in medicine, the study of biofilm formation of *Pseudomonas aeruginosa* on the opportunistic fungal pathogen *Candida albicans* could provide insights into the link between biofilm formation and virulence⁵. In agriculture, studies suggest that plant-growth-promoting rhizobacteria and biocontrol bacteria have an increased efficiency when associated with a fungus in a mixed biofilm. For example, *Bradyrhizobium elkanii* have enhanced N₂-fixing activity when associated with *Pleurotus ostreatus* in a mixed biofilm⁶.

Finally, in bioremediation, bacterial-fungal mixed biofilms have been used for the remediation of polluted sites^{7,8}.

LSCM is particularly suitable to study biofilms since it allows for a three-dimensional observation of living hydrated biofilms with minimum pretreatments, thereby maintaining biofilm structure and organization. Thus, biofilm analysis by LSCM is very informative, especially to determine the time course of the biofilm formation and the detection of characteristic stages^{9,10}, from the adhesion step to the development of a mature biofilm. It is also particularly adapted to visualize the biofilm structure and matrix^{11,12} or to quantify the biofilm size^{13,14}.

Although this method is suitable to study biofilms on abiotic or thin biotic surfaces, studying bacterial biofilm on a fungal filamentous colony is still very challenging. Indeed, most filamentous fungi build thick, complex, tridimensional networks in culture. Even if thick objects can be imaged by confocal microscopy, the attenuation of the laser penetration and the fluorescence emission often decrease the quality of the final images over a depth of 50 μm ¹⁵. Moreover, because fungal colonies are not rigid, it is difficult to handle the microorganisms without disturbing the biofilms. Due to the thickness of the samples, the few microscopic analyses of bacterial biofilms on fungal hyphae are usually only performed on a small part of the fungal colony, therefore containing only few hyphae¹⁶⁻¹⁸. All this limits our ability to describe biofilm distribution on the fungal colony and thus can bring biases into the analysis in case of the heterogenic distribution of the biofilm within the fungal colony.

To overcome such difficulties, we report a method for the growth and the analysis of bacterial biofilm on fungal hyphae. This method was applied to study the biofilm formation in *Pseudomonas fluorescens* BBc6 on the hyphae of the ectomycorrhizal basidiomycete *Laccaria bicolor* S238N. These two forest-soil microorganisms were previously described to form mixed biofilm-like structure^{19,20}. This method can easily be further adapted to other filamentous fungal/bacterial systems. The method presented here is based on the combination of a fungal culture method, allowing for the growth of very thin fungal colonies, with LSCM and SEM imaging. This permitted us to obtain micro- (μm range) and meso- (mm range) scale views of the interaction between the two microorganisms, allowing for

the qualitative characterization of the biofilm. We also showed that the samples can be observed with SEM, permitting structural analysis of the biofilm at the nano-scale level (nm range).

4.2.3 Protocol

1. Preparation of bacterial and fungal cultures

1. Preparation of fungal cultures

1. Prepare cellophane membranes with the same diameter as the Petri dishes and boil them in EDTA (1 g L^{-1} in deionized water) for 30 min. Rinse the sheets with deionized water and autoclave them twice.
2. Prepare a fungal pre-culture by inoculating fungal agar plugs on the appropriate agar medium covered with an EDTA pre-treated cellophane membrane. Incubate it at the optimal growth temperature to obtain colonies approximately 1 cm in diameter.
 1. For *L. bicolor* S238N, incubate at 25°C for 5 days on Pachlewski P5 agar medium, made of 0.5 g of diNH_4 tartrate, 1 g of KH_2PO_4 , 0.5 g of $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 5 g of Maltose D+, 20 g of Glucose D+, 1 mL of 10% Thiamine-HCl, 1 mL of 1/10 diluted micronutrient solution (6 g L^{-1} ferrous sulfate; 0.27 g L^{-1} molybdenum trioxide; 8.45 g L^{-1} boric acid; 5 g L^{-1} manganese sulfate; 5 g L^{-1} cupric sulfate; 2.27 g L^{-1} zinc sulfate) made up to 1 L with deionized water; and 20 g of agar; pH 5.5.
3. From the fungal pre-culture, inoculate a new agar plate covered with the EDTA pre-treated cellophane membrane containing a low-carbon agar medium to promote the radial expansion of the colonies.
 1. To inoculate the Petri dish, gently scratch the external area (where cells have the same physiological state) of a fungal colony from the pre-culture with a scalpel and transfer the hyphae to the new agar plate.
 2. Incubate at the optimal growth temperature until the new colonies are approximately 1 cm in diameter. For *L. bicolor* S238N,

incubate them at 25 °C for 5 days on P20 agar medium (0.25 g of diNH₄ tartrate; 0.5 g of KH₂PO₄; 0.25 g of MgSO₄ · 7 H₂O; 1 g of Glucose D+; 0.5 mL of 10% Thiamine-HCl; 0.5 mL of 1/10 diluted micronutrient solution (cf 1.1.2.1), made up to 1 L with deionized water; and 20 g of agar; pH 5.5).

Note : Due to the pre-culture on cellophane, the second culture will not contain agar media in the central plugs. The agar plugs should be removed for further analysis of the biofilms, since these plugs introduce agar and nutrients that can create biases in the analysis. This step concerns only fungal species that are kept and propagated on agar plates, and it is not necessary for fungi that are propagated from spores or frozen stocks.

2. Preparation of bacterial cultures

1. Use a sterile loop to collect 2 to 3 individual bacterial colonies from a culture on the appropriate agar medium and inoculate 25 mL of liquid Luria-Bertani (LB) medium (or any other appropriate medium, depending on the strain used). For *P. fluorescens* BBc6, incubate an overnight culture at 28 °C with gentle shaking (~150 rpm).

Note : Using a strain tagged with fluorescent protein, such as GFP, is preferable, because this avoids performing a double-staining (fungus and bacteria) prior to microscopic observations. The timing, the stirring speed, and the temperature of the incubation depend on the strain used, the goal being to obtain a culture in late exponential growth.

2. Preparation of N *in vitro* biofilm of bacteria on the fungal colony

1. Centrifuge the bacterial culture at 5000 g for 3 min and suspend the pellet in 25 mL of sterile 0.1 M potassium phosphate buffer (25 g L⁻¹ KH₂PO₄ and 2.78 g L⁻¹ K₂HPO₄, pH 5.8). Repeat this step once and adjust the final bacterial concentration to 10⁹ cells/mL with the same buffer.

2. Fill a 6-well microplate with 5 mL of the bacterial suspension (or sterile 0.1 M potassium phosphate buffer for the negative control).
3. Cut the cellophane membrane of the fungal culture with a sterile razor blade to obtain squares of cellophane with a single fungal colony on each membrane. Carefully remove the cellophane squares containing hyphae from the solid medium using forceps and transfer the square of cellophane containing hyphae to a well of the microplate containing the bacterial suspension.
4. Gently shake the microplate while the fungal colonies are still attached to the cellophane; then, remove the cellophane sheets, leaving the fungal colonies in the plate.
5. Incubate the microplate with gentle agitation (~60 rpm) at a temperature adapted to the studied microorganisms.

Note : The time of incubation depends on the speed of establishment of the biofilm and the stage to be analyzed. For *P. fluorescens* BBc6/*L. bicolor*, incubate at 20 °C for 30 min to get early-stage biofilms and up to 16 h to get mature biofilms.

3. Laser Scanning Confocal Microscopy analysis of the biofilm formation

1. Sample preparation
 1. To remove planktonic bacteria and bacteria electrostatically-attached to the hyphae, rinse the fungus by transferring it to a new 6-well microplate filled with 5 mL of a strong salt solution (NaCl, 17 g L⁻¹)¹⁷; gently shake for 1 min.
 2. Transfer the fungus to a new 6-well microplate containing 5 mL of sterile 0.1 M potassium phosphate buffer, gently shake for 2 min, and transfer the fungus to fresh potassium phosphate buffer.
 3. Cut the part of the fungal colony to be imaged with a scalpel while keeping it in the potassium phosphate buffer, such that the obtained section contains about half of the fungal colony.

4. To stain the sample, transfer it to a Petri dish filled with sterile water containing an appropriate fluorescent dye (depending on the aim of the analysis), and incubate it in the dark.
 1. To visualize the fungal network, use, for example, Congo Red (0.1% final concentration, 5 min of incubation), wheat germ agglutinin (WGA) lectin conjugated to Alexa Fluor 633 ($10\text{ }\mu\text{g mL}^{-1}$ final concentration, 10 min of incubation), or FUN 1 ($10\text{ }\mu\text{M}$ final concentration, 10 min of incubation).
 2. If using a non-fluorescent-tagged bacterium, counterstain the bacterial cells with a DNA-specific fluorescent probe among the numerous cell-permeant DNA dyes commercially available. For example, use DAPI ($0.25\text{ }\mu\text{g mL}^{-1}$ final concentration, 10 min of incubation).
 3. To visualize the matrix proteins, use a protein stain²¹.
5. After staining, rinse the sample by transferring it to a Petri dish lid containing 10 mL of sterile 0.1 M potassium phosphate and gently shake for 1 min.
6. Half submerge a slide in the Petri dish lid and delicately bring the cut section to float above the slide. Then, slowly remove the slide from the buffer solution, allowing the sample to gently settle on the slide.

Note : For this step, it is very important to proceed gently to avoid biofilm disturbance.

7. Finally, add $10\text{ }\mu\text{L}$ of anti-fading mounting medium to the sample and cover it with a glass coverslip.

Note : Once the slide is prepared, the microscopic analysis must be performed as soon as possible (within at most 30 min) to avoid modification in the biofilm structure.

2. Confocal microscopic analysis

1. Examine the slides under a confocal laser microscope with a 10x or 40x objective lens coupled to imaging software.

Note : Here, a multi-beam scanning confocal microscope equipped with 405-, 488-, and 561-nm excitation lasers, a GaAsP PMT detector, and 10x 0.3 NA and 40x 1.2 NA objectives was used.

1. Perform imaging using parameters adapted to the type of data requested and to the time constraints. Use laser excitation/ emission wavelengths according to the stain used and to the manufacturer's recommendations. Use a combination of tile scan and the Z-stack functions to obtain global 3D views of the fungal colony and the biofilms.

Note : Images on Figure 4.3 were acquired using the following parameters : 8-bit/pixel, averaging = 2, pixel dwell = 1.58 μ s, tiles scan of 5x5 images with online stitching (10% coverage, threshold = 0.7) ; Z-step = 2 μ m.

2. For 3D data visualization, use one of the many free or commercial softwares (these offer many options for 3D rendering).
 1. For example, to display Z-stack data as 2D maximum intensity projections, subtract the bright-field channel, adjust the brightness and contrast, and merge channels to create a composite image. If they are present, eliminate slices without signal at the Z-stack extremities. Then, perform a 2D maximum-intensity projection and convert the result into RGB color. Use the "Z project" function in the ImageJ software²² to obtain the images presented here by 2D maximum intensity projections.

4. Electron microscopy analysis

1. Prepare the samples as described for LSCM, except in step 3.1.2, transfer the biofilms to sterile water instead of potassium phosphate buffer after the rinse steps. This avoids the formation of salt crystals during the dehydration step, which would perturb SEM imaging.
2. Transfer the biofilms to a sample holder and remove excess water ; only allow a small pellicle of water to cover the sample.

3. Transfer the sample to the chamber of a variable-pressure scanning electron microscope (VP-SEM); freeze it to -50°C on a Peltier cooling stage; and allow it to slowly freeze-dry, directly in the SEM chamber, with 100 Pa of variable pressure set for 15 h.
4. After completion of the freeze-drying, retrieve the sample and transfer it into a high-vacuum film deposition system. Coat the sample with 2 nm of platinum (quartz measurement) under argon plasma (2.5×10^{-2} mbar, 35 mA).
5. Observe the coated sample with an SEM equipped with a field emission gun (FEG) using the high resolution "in lens" detector and an electronic high tension of 1 kV.

4.2.4 Representative Results

The overall schematic procedure of fungal culture and biofilm preparation are given in Figure 4.1. The culture method allowed us to obtain fungal colonies 20 to 50 μm thick containing a few layers of hyphae, allowing micro- and meso-scale analyses of hydrated living biofilm using LSCM. The application of the method permitted the acquisition of high-quality images of *P. fluorescens* BBc6 biofilms on *L. bicolor* hyphae along the formation of the biofilm (Figures 4.2-4.4).

The meso-scale analysis of the biofilms demonstrated the heterogenic distribution of the biofilm of *P. fluorescens* BBc6 on the hyphae of *L. bicolor* S238N (Figures 4.2 and 4.3). Meso-scale analysis also allowed for the tracking of the biofilm formation over time (Figure 4.3) from the early steps, in which only some bacteria were attached to hyphae (Figure 4.3a), to the formation of a thick, mature biofilm (Figure 4.3b). The high resolution of the meso-scale images allowed us to perform micro-scale analysis on the same images in order to obtain the colony architectures (Figure 4.3c-d).

The micro-scale analysis combined with the specific labeling enabled us to go a step further in biofilm characterization. Here, SYPRO Ruby²³, which labels most classes of proteins, was applied to the samples (Figure 4.4) and shows the presence of proteins in the matrix.

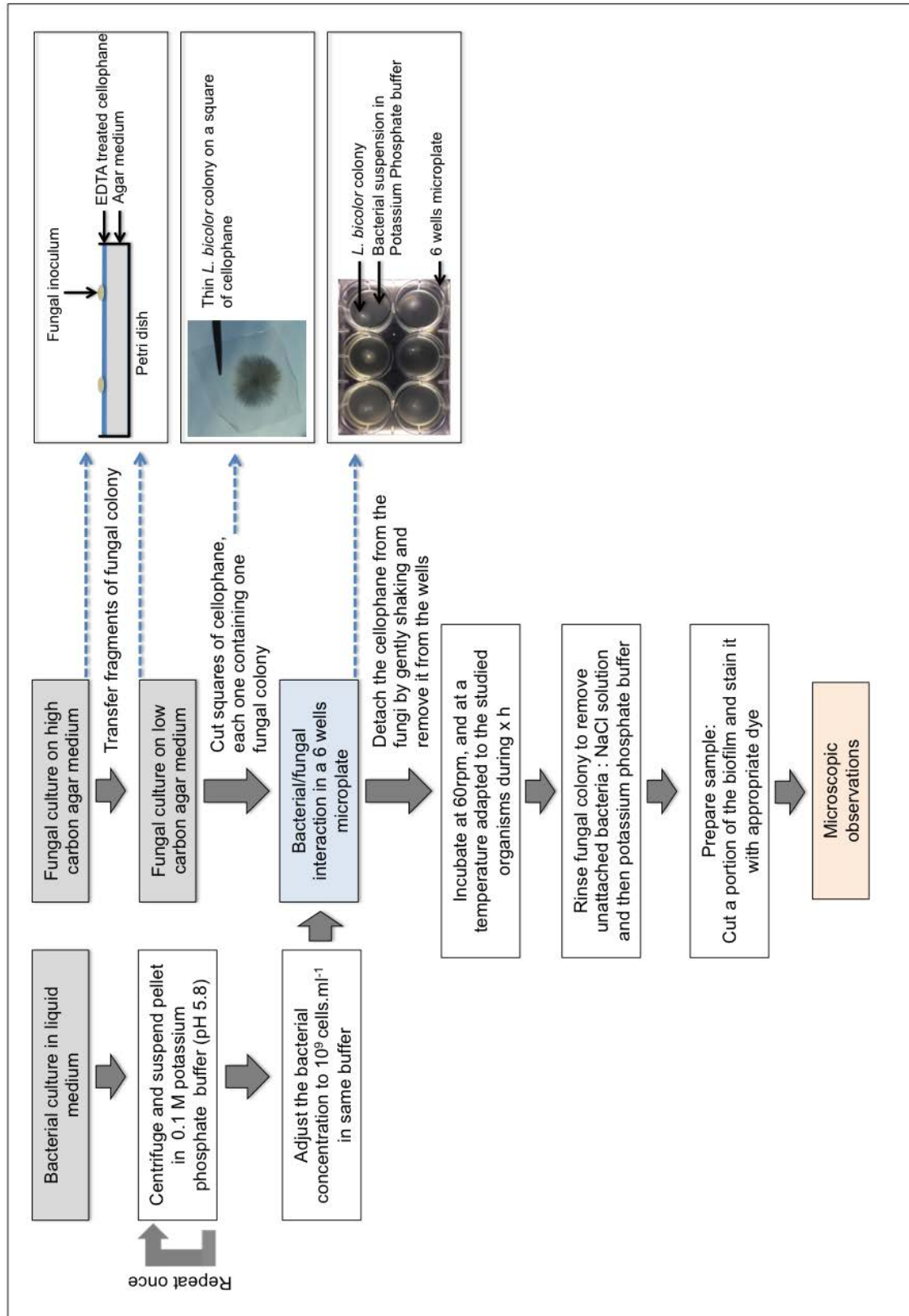


Figure 4.1 – Overall schematic procedure of fungal culture and biofilm preparation. This figure describes the main steps of the method, from microorganism cultures to sample analyses. More details are given in the protocol.

Finally, further details of the biofilm structure were obtained by SEM imaging of the same sample after dehydration and coating (Figure 4.5). SEM imaging provided access to the nanoscale level, thus giving access to the matrix structure.

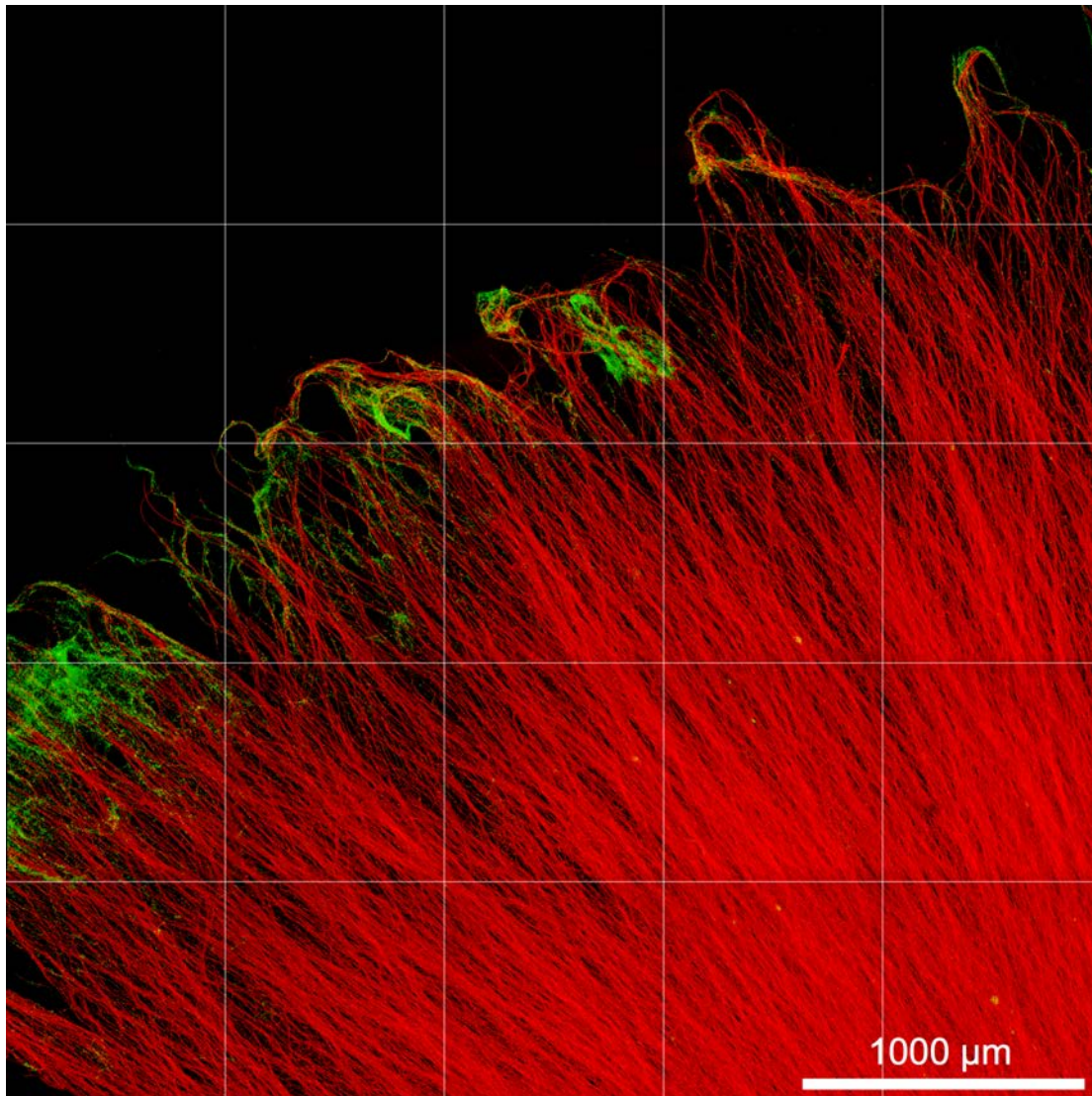


Figure 4.2 – BBc6 biofilms repartition on the fungal colony.

The sample was imaged after 18 h of interaction at 10x magnification. The image was obtained via 2D maximum intensity projection of 3D confocal microscopy images. The grey grid on the figure depicts the mosaic positions. *L. bicolor* hyphae are stained with Congo Red (red); bacteria are GFP-tagged (green).

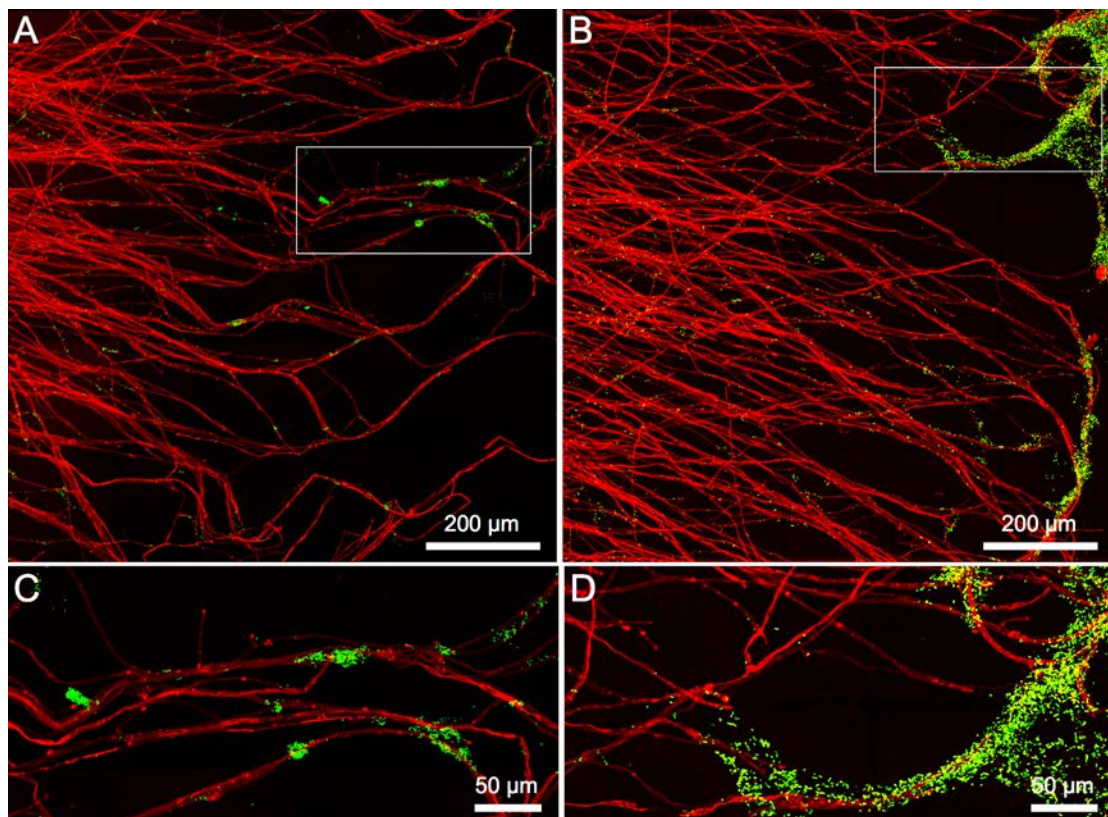


Figure 4.3 – Early and late stages of BBc6 biofilm formation on *L. bicolor* hyphae.

This image was obtained via 2D maximum intensity projection of 3D confocal microscopy images. Imaging was performed at 40x magnification. a) Biofilms repartition after 2 h of interaction. b) Biofilm repartition after 14 h of interaction. c) Enlargement of the white rectangle in a). d) Enlargement of the white rectangle in b). Fungal hyphae are stained with Congo Red (red) and bacteria are GFP-tagged (green).

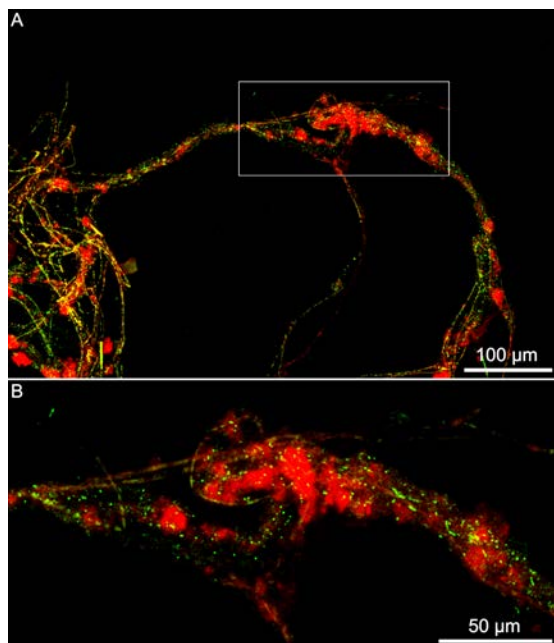


Figure 4.4 – Matrix staining of BBc6 biofilm on *L. bicolor* hyphae.

a) Biofilms after 16 h of interaction. b) Enlargement of the white rectangle in a). Imaging was performed at 40x magnification, and these images were obtained via 2D maximum intensity projection of 3D confocal microscopy images. Bacteria are GFP-tagged (green), fungus is stained with Fun1 (dark green), and proteins are stained with S. Ruby (red).

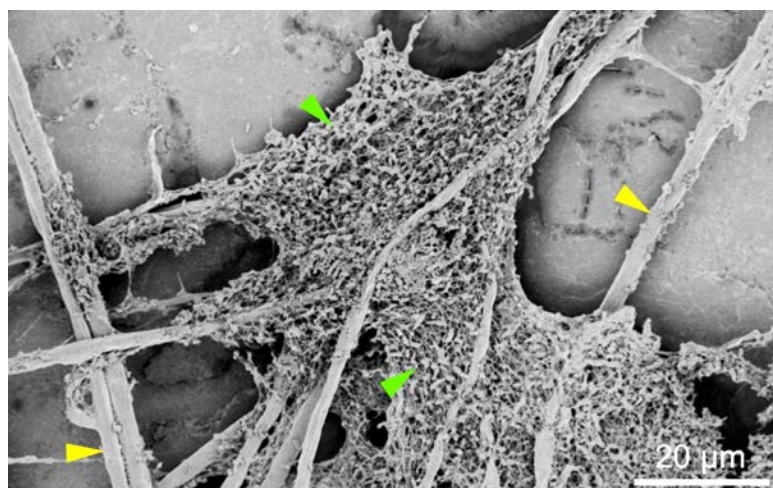


Figure 4.5 – SEM imaging of BBc6 biofilms on *L. bicolor* hyphae.

SEM Imaging was performed at 2360X, EHT : 1 kV. Before imaging, the sample was slowly freeze-dried in the SEM chamber and coated with platinum. Green arrows point to bacterial biofilms and yellow arrows point to fungal hyphae.

4.2.5 Discussion

Bacterial biofilms are retrieved in many environments and have been studied since the 1950s, leading to the development of a number of methods to analyze them²⁴. Classical methods to quantify and monitor biofilms include micro-titer assays and, the most widely-used method, crystal violet (CV) staining. These methods are fast, low cost, and easy to handle²⁵ and are particularly useful to quantify total biofilm biomass or to perform viability and matrix quantification assays. On an other hand, "omics" methods are also useful in biofilm studies, allowing for quantitative and functional analyses of biofilms^{26,27}. Despite the advantages of micro-titer plate and "omics" methods, several essential features of biofilms cannot be captured with these techniques, hindering a complete understanding of this process. Such features include matrix structures, bacterial colony architectures, cell/cell interactions, and colonization patterns, which are key data for understanding both the functioning of biofilms and the dynamics of their formation. Despite the capacity of microscopy to capture these features, microscopy analysis of bacterial biofilms on filamentous fungi are still scarce. This is mainly due to the growth of filamentous fungi, which often forms colonies of thick, complex, tridimensional networks. Formation of bacterial biofilms on fungi is common in diverse environments and is significantly involved in various fields⁴ (*e.g.*, medicine, agriculture, and environment); hence, it is critical to develop new methods to facilitate their investigation. To this end, we combined a method to generate very thin fungal colonies with microscopic imaging of the bacterial biofilms. In addition, we proposed a set of microscopy tools to qualitatively analyze those biofilms. The success of the method relies upon the ability to produce very thin hyphal colonies and to apply the appropriate dyes. These points are discussed below.

Due to the complex structures of the biofilms, understanding their function requires a multi-scale approach^{28,29}. Distribution patterns of the biofilms, bacterial colony architecture, and matrix structure and composition are analyzed at different scales (*i.e.*, meso-scale and micro-scale). Moreover, nanoscale resolution allows access to the cell/cell physical interactions and the nano-structure of the

matrix. Thus, the developed method easily enables a multi-scale analysis of the bacterial biofilms formed on the fungal colony.

In most studies, LSCM analyses of biofilms are limited to the micro-scale, the meso-scale usually being performed by optical coherence tomography³⁰⁻³². The method presented here enables both micro- and meso-scale analyses by LSCM. It demonstrates the utility of combining both analyses in the same region of the sample and even on the same image using new-generation confocal microscopes with high resolution (Figure 4.3). Thus, issues linked to compiled data gathered at different scales with different methods are here avoided.

This combination of analyses gave access concomitantly to the biofilm repartition on the fungal colony, the bacterial colony architecture along the developing biofilm, and the matrix structure. The meso-scale analysis showed a heterogenic distribution of the bacterial biofilms on the fungal colonies (Figures 4.2 and 4.3). This observation would not have been possible with protocols that only permit imaging of a small portion of the fungal colony, which is not necessarily representative of the entire colony. Thus, while often neglected, the meso-scale analysis can give precious information about biofilm distribution patterns.

Finally, the developed method can be used to analyze samples with different microscopy techniques, including scanning electron microscopy. Here, SEM was used to reach the nano-scale and to obtain the bacterial spatial organization within the biofilm. It performed very well with the thin fungal colonies, while SEM only permitted surface imaging. In contrast to LSCM, SEM, however, required sample dehydration and, most often, coating with a conductive metal. This dehydration process might alter biological structures when it is not properly executed and may require optimization. Here, sample dehydration using slow lyophilization was used³³. Nevertheless, applying both LSCM and SEM to the samples will allow the performance of correlative microscopy at the same location of the sample.

Despite the advantages described above, some limitations exist. Firstly, it may not be applicable to all kind of fungi. Indeed, this culturing method is developed for fungi spreading radially on the surface of solid media. This method may not be suitable for fungi forming mainly aerial hyphae (*e.g.*, *Fusarium sp.*) or for micro-

aerobic fungi spreading mainly inside agar. Moreover, fungi degrading cellophane may be problematic as well (*e.g.*, *Trichoderma sp.*). Secondly, it is important to note that the staining strategy is a critical point and the choice of the stain must be made carefully, as the stain must not disturb the biofilm. For example, we noticed that Calcofluor White caused partial biofilm disruption (data not shown), likely due to the high pH of this stain. Also, some dyes produced heterogeneous staining (*e.g.*, Congo Red), while others produced homogeneous staining (*e.g.*, cell wall staining with WGA lectin), giving a heterogeneous image quality. Moreover, it is important to be aware that some dyes might not be fully specific. For example, WGA stains not only fungal cell walls but also N-acetylneuraminic acid in gram-positive bacterial cell walls and adhesins produced by gram-positive and -negative bacteria during biofilm formation^{34,35}. Therefore, using fluorescent protein-tagged bacteria and/or fungi is recommended to avoid multiple staining. If multiple dyes are used, they must not chemically interfere, and their emission spectra should not overlap.

Meso-scale analyses require a large scanned area, and therefore, LSCM may be time-consuming (40 min to 1 h, depending on the sample thickness) and bottleneck the analysis of a large number of samples. Nonetheless, adjustments can be made depending on the type of data required. It is possible to decrease acquisition time and image size by altering the image quality. For example, high resolution is not necessary to analyze the biofilm general repartition.

Finally, some limitations need to be considered when choosing to display Z-stack data as 2D or 3D projections. Two-dimensional projections are a good way to summarize data, but depth information is lost, and overlapped structures become hidden. On the other hand, 3D projections allow the visualization from different points of view, but they often render poorly in case of spatial complexity.

In conclusion, we have reported a method for the characterization of bacterial biofilms on hyphae at the structural level. The methodology can be extended to other applications. Indeed, this method allows the performance of functional or chemical characterization of bacterial biofilms forming on fungal hyphae. Due to the great variety of existing fluorescent reporter systems, LSCM analysis can be used for multiple purposes²⁹. For example, the fluorescence microscopy could be

used to monitor pH gradient³⁶ or molecule diffusion in biofilms³⁷. Additionally, the method allows for community analysis in multispecies biofilms. For example, fluorescence *in situ* hybridization targeting specific bacterial groups is particularly useful to study specific bacterial repartition in multispecies biofilms^{38,39}. Last, numerous fluorescent dyes can be used to characterize the matrix composition of the biofilms²¹. Here, proteins were targeted using Sypro, which stains a large range of proteins, among them matrix proteins (Figure 4.4), but other dyes allow for the visualization of other important matrix constituents, such as exopolysaccharides or extracellular DNA. Interestingly, all these analyses could be performed at the meso-scale using the described method. Since LSCM can be performed on living samples, it is also possible to achieve time-lapse imaging using, for example, coverwell chambers, particularly suitable for thin fungal colonies. This option is particularly interesting, as biofilm formation is a complex, dynamic process. Finally, for a quantitative purpose, the reported method may improve the accuracy of automatic quantitative analysis by making this quantification possible on meso-scale images. This may overcome biofilm heterogeneity and statistical issues²⁹.

Disclosures

The authors have nothing to disclose.

Acknowledgements

This work was supported by the French National Research Agency through the Laboratory of Excellence ARBRE (ANR-11-LABX-0002-01), the Plant-Microbe Interfaces Scientific Focus Area in the Genomic Science Program, and the Office of Biological and Environmental Research in the DOE Office of Science. Oak Ridge National Laboratory is managed by UT-Battelle, LLC, for the United States Department of Energy under contract DE-AC05-00OR22725.

References

1. Frey-Klett, P., Burlinson, P., Deveau, a., Barret, M., Tarkka, M., & Sarniguet, a. Bacterial-Fungal Interactions : Hyphens between Agricultural, Clinical, Environmental, and Food Microbiologists. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **75** (4), 583-609 (2011).
2. Scherlach, K., Graupner, K., & Hertweck, C. Molecular bacteria-fungi interactions : effects on environment, food, and medicine. *Annu. Rev. Microbiol.* **67**, 375-97 (2013).
3. Schroeckh, V., Scherlach, K., *et al.* Intimate bacterial-fungal interaction triggers biosynthesis of archetypal polyketides in *Aspergillus nidulans*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **106** (34), 14558-14563 (2009).
4. Hogan, D. A, Wargo, M. J., & Beck, N. Bacterial Biofilms on Fungal Surfaces. In *Biofilm mode of life : mechanisms and adaptations*. 13, 235-245 (2007).
5. Hogan, D. A., & Kolter, R. *Pseudomonas* - *Candida* interactions : an ecological role for virulence factors. *Science* . **296** (5576), 2229-2232 (2002).
6. Jayasinghearachchi, H. S., & Seneviratne, G. Can mushrooms fix atmospheric nitrogen ? *J. Biosci.* **29** (3), 293-6 (2004).
7. Seneviratne, G., Zavahir, J. S., Weerasekara, W. M. M. S., & Bandara, M. L. M. A. Fungal-bacterial biofilms : their development for novel biotechnological applications. *World J Microbiol Biotechnol.* , 739-743 (2008).
8. Herath, H. M. L. I., Upamali, A., Vithanage, M., & Seneviratne, G. Developed fungal - bacterial biofilms as a novel tool for bioremoval of hexavalent chromium from wastewater. *Chem. Ecol.* **00** (0), 1-10 (2014).
9. Macedo, A. J., Kuhlicke, U., Neu, T. R., Timmis, K. N., & Abraham, W. R. Three stages of a biofilm community developing at the liquid-liquid interface between polychlorinated biphenyls and water. *Appl. Environ. Microbiol.* **71** (11), 7301-7309 (2005).
10. Da Silva, W. J., Seneviratne, J., Samaranayake, L. P., & Del Bel Cury, A. A. Bioactivity and architecture of *Candida albicans* biofilms developed on poly(methyl methacrylate) resin surface. *J. Biomed. Mater. Res. - Part B Appl. Biomater.* **94** (1), 149-156 (2010).
11. Flemming, H., & Wingender, J. The biofilm matrix. *Nat. Publ. Gr.* **8** (9), 623-633 (2010).
12. Cerca, N., Gomes, F., Pereira, S., Teixeira, P., & Oliveira, R. Confocal laser scanning microscopy analysis of *S. epidermidis* biofilms exposed to farnesol, vancomycin and rifampicin. *BMC Res. Notes.* **5**, 244 (2012).
13. Lepanto, P., Lecumberry, F., Rossello, J., & Kierbel, A. A confocal microscopy image analysis method to measure adhesion and internalization of *Pseudomonas aeruginosa* multicellular structures into epithelial cells. *Mol. Cell. Probes.* **28** (1), 1-5 (2014).
14. Mueller, L. N., de Brouwer, J. F. C., Almeida, J. S., Stal, L. J., & Xavier, J. B. Analysis of a marine phototrophic biofilm by confocal laser scanning microscopy using the new image quantification software PHILIP. *BMC Ecol.* **6**, 1 (2006).

15. Murray, J. M. Methods for imaging thick specimens : Confocal microscopy, deconvolution, and structured illumination. *Cold Spring Harb. Protoc.* **6** (12), 1399-1437 (2011).
16. Toljander, J. F., Artursson, V., Paul, L. R., Jansson, J. K., & Finlay, R. D. Attachment of different soil bacteria to arbuscular mycorrhizal fungal extraradical hyphae is determined by hyphal vitality and fungal species. *FEMS Microbiol. Ecol.* **254**, 34-40 (2006).
17. Brandl, M. T., Carter, M. Q., Parker, C. T., Chapman, M. R., & Huynh, S. *Salmonella* Biofilm Formation on *Aspergillus niger* Involves Cellulose - Chitin Interactions. *PLoS One.* **6** (10) (2011).
18. Balbontín, R., & Vlamakis, H. Mutualistic interaction between *Salmonella enterica* and *Aspergillus niger* and its effects on *Zea mays* colonization. *Microb. Biotechnol. Publ.* (2014).
19. Frey-Klett, P., Garbaye, J., & Tarkka, M. The mycorrhiza helper bacteria revisited. *New Phytol.* **176** (1), 22-36 (2007).
20. Deveau, A., Brulé, C., *et al.* Role of fungal trehalose and bacterial thiamine in the improved survival and growth of the ectomycorrhizal fungus *Laccaria bicolor* S238N and the helper bacterium *Pseudomonas fluorescens* BBc6R8. *Environ. Microbiol. Rep.* **2** (4), 560-8 (2010).
21. Neu, T. R., & Lawrence, J. R. Advanced Techniques for *In Situ* Analysis of the Biofilm Matrix (Structure, Composition, Dynamics) by Means of Laser Scanning Microscopy. *Methods Mol. Biol.* **1147**, 43-64 (2014).
22. Rasband, W. S. *imagej*. <http://imagej.nih.gov/ij> (2016).
23. Berggren, K. N., Schulenberg, B., *et al.* An improved formulation of SYPRO Ruby protein gel stain : Comparison with the original formulation and with a ruthenium II tris (bathophenanthroline disulfonate) formulation. *Proteomics.* **2** (5), 486-498 (2002).
24. Pantanella, F., Valenti, P., Natalizi, T., Passeri, D., & Berlutti, F. Analytical techniques to study microbial biofilm on abiotic surfaces : pros and cons of the main techniques currently in use. *Ann. di Ig.* **25** (1), 31-42 (2013).
25. Toole, G. A. Microtiter Dish Biofilm Formation Assay. *J. Vis. Exp.* (47), 3-5 (2011).
26. Azevedo, N. F., Lopes, S. P., Keevil, C. W., Pereira, M. O., & Vieira, M. J. Time to "go large" on biofilm research : Advantages of an omics approach. *Biotechnol. Lett.* **31** (4), 477-485 (2009).
27. Koerdt, A., Orell, A., *et al.* Macromolecular fingerprinting of *Sulfolobus* species in biofilm : A transcriptomic and proteomic approach combined with spectroscopic analysis. *J. Proteome Res.* **10** (9), 4105-4119 (2011).
28. Morgenroth, E., & Milferstedt, K. Biofilm engineering : Linking biofilm development at different length and time scales. *Rev. Environ. Sci. Biotechnol.* **8** (3), 203-208 (2009).

29. Neu, T. R., & Lawrence, J. R. Innovative techniques, sensors, and approaches for imaging biofilms at different scales. *Trends Microbiol.* **23** (4), 233-242 (2015).
30. Xi, C., Marks, D., Schlachter, S., Luo, W., & Boppart, S. A. High-resolution three-dimensional imaging of biofilm development using optical coherence tomography. *J. Biomed. Opt.* **11** (3), 34001 (2006).
31. Janjaroen, D., Ling, F., *et al.* Roles of ionic strength and biofilm roughness on adhesion kinetics of *Escherichia coli* onto groundwater biofilm grown on PVC surfaces. *Water Res.* **47** (7), 2531-2542 (2013).
32. Derlon, N., Koch, N., *et al.* Activity of metazoa governs biofilm structure formation and enhances permeate flux during Gravity-Driven Membrane (GDM) filtration. *Water Res.* **47** (6), 2085-2095 (2013).
33. Karcz, J., Bernas, T., Nowak, A., Talik, E., & Woznica, A. Application of lyophilization to prepare the nitrifying bacterial biofilm for imaging with scanning electron microscopy. *Scanning.* **34** (1), 26-36 (2012).
34. Burton, E., Yakandawala, N., LoVetri, K., & Madhyastha, M. S. A microplate spectrofluorometric assay for bacterial biofilms. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* **34** (1), 1-4 (2007).
35. Berne, C., Ducret, A., Hardy, G. G., & Brun, Y. V Adhesins Involved in Attachment to Abiotic Surfaces by Gram-Negative Bacteria. *Microbiol. Spectr.* **3** (4), 1-45 (2015).
36. Schlafer, S., Garcia, J. E., Greve, M., Raarup, M. K., Nyvad, B., & Dige, I. Ratiometric imaging of extracellular pH in bacterial biofilms with C- SNARF-4. *Appl. Environ. Microbiol.* **81** (4), 1267-1273 (2015).
37. Daddi Oubekka, S., Briandet, R., Fontaine-Aupart, M. P., & Steenkest, K. Correlative time-resolved fluorescence microscopy to assess antibiotic diffusion-reaction in biofilms. *Antimicrob. Agents Chemother.* **56** (6), 3349-3358 (2012).
38. Almeida, C., Azevedo, N. F., Santos, S., Keevil, C. W., & Vieira, M. J. Discriminating multi-species populations in biofilms with peptide nucleic acid fluorescence *in situ* hybridization (PNA FISH). *PLoS One.* **6** (3) (2011).
39. Malic, S., Hill, K. E., Hayes, A., Percival, S. L., Thomas, D. W., & Williams, D. W. Detection and identification of specific bacteria in wound biofilms using peptide nucleic acid fluorescent *in situ* hybridization (PNA FISH). *Microbiology.* **155** (8), 2603-2611 (2009).

Chapitre 5

Mise au point d'une méthode quantitative d'analyse de la formation de biofilms bactériens sur hyphes fongiques

5.1 Introduction

La méthode présentée dans le chapitre précédent permet une analyse qualitative de la formation de biofilms bactériens sur des hyphes fongiques. Elle permet d'étudier la dynamique de formation des biofilms, leur répartition spatiale, ainsi que la structure et la composition de leur matrice. Cependant, cette méthode ne permet pas de comparer la densité des biofilms formés entre différents échantillons, sauf si cette différence est très nette (*eg.* fig. 4.3, fig. 6.1). Or, pour pouvoir décrire de façon plus fine l'interaction physique entre BBc6 et *L. bicolor*, il est nécessaire de tester les effets de différents paramètres sur la formation de biofilms, comme par exemple l'influence de l'état physiologique de la colonie fongique ou bien l'influence des paramètres chimiques du milieu. Ceci requiert de trouver une méthode quantitative qui soit applicable à l'analyse de biofilms formés sur des hyphes.

5.1.1 Méthodes existantes pour l'analyse quantitative des biofilms

Beaucoup de méthodes d'analyse quantitative de biofilms sont décrites dans la littérature, chacune comportant ses avantages et inconvénients, et chacune donnant accès à un type différent d'information.

Méthode colorimétrique par marquage au cristal violet

La méthode la plus employée est la méthode de marquage au cristal violet (Abhishek *et al.* 2016 ; Matz *et al.* 2005 ; Pitts *et al.* 2003). Les biofilms formés en microplaque sont marqués au cristal violet, puis après une extraction alcoolique, la quantité de colorant fixé est estimée par simple mesure spectro-photométrique (Merritt *et al.* 2011). Cette méthode est simple, rapide et peu coûteuse. Cependant, le cristal violet se fixe aux cellules mais également à beaucoup de constituants des matrices des biofilms, la densité mesurée correspondra donc aux biofilms dans leur ensemble (matrice incluse) et non à une densité cellulaire (Merritt *et al.* 2011 ; Li *et al.* 2003). De plus, si cette méthode est très utilisée pour la quantification de biofilms sur surface abiotique, il n'est par contre pas envisageable de l'utiliser sur surface fongique puisque le cristal violet se fixerait également aux hyphes.

Méthode par dénombrement d'unité formant colonies

Une autre méthode couramment employée et la détermination du nombre d'Unité Formant Colonies (UFC) à partir d'une suspension de biofilms, qui offre l'avantage de quantifier les cellules viables du biofilms (Fernandes *et al.* 2016 ; Zago *et al.* 2015 ; Da Silva Meira *et al.* 2012). Cependant, deux facteurs de biais majeurs sont inhérents à cette méthode. Tout d'abord, elle nécessite en amont une étape de décrochage des biofilms de leurs supports. Généralement réalisé par agitation ou sonication, le décrochage des biofilms est une étape délicate. Une puissance de décrochage trop faible risque de laisser une partie des biofilms sur leurs supports alors qu'une puissance trop forte risque de compromettre la viabi-

lité des cellules (Pantanella *et al.* 2013). Ensuite, cette méthode va permettre de quantifier les bactéries viables mais nécessite qu’elles soient également cultivables. Un biais sera donc apporté par la présence de bactéries Viables Mais Non Cultivables (VMNC), correspondant par exemple à des cellules stressées ou en état de carence. Ainsi, bien que viables, ces bactéries ne vont pas croître et former des colonies, elles seront donc omises de la quantification (Li *et al.* 2014). En revanche, cette méthode s’est montrée applicable à l’étude de biofilms formés sur surfaces biotiques et a même été utilisée pour l’étude des biofilms formés par une souche de *Salmonella enterica* sur les hyphes de *Aspergillus niger* (Balbontin et Vlamakis 2014).

Méthode par PCR quantitative

Une façon de passer outre les problèmes dus aux bactéries VMNC est l’utilisation de méthodes d’analyse moléculaire. Il est par exemple possible de quantifier les bactéries constituant un biofilm via une analyse par PCR quantitative en temps réel (PCRq), en ciblant une séquence d’ADN spécifique de la bactérie étudiée (Ammann *et al.* 2013 ; Sha *et al.* 2013 ; Guilbaud *et al.* 2015). L’inconvénient de cette méthode est qu’elle ne permet pas de discriminer l’ADN des cellules viables de celui des cellules mortes. Pour résoudre ce problème il est possible de cibler l’ARN au lieu de l’ADN en passant par une PCRq avec transcription inverse (RT-PCRq). En effet, l’ARN ayant un temps de demi-vie court, il peut constituer une bonne cible pour la quantification des bactéries viables (Sheridan *et al.* 1998 ; Coutard *et al.* 2005). Au même titre que la méthode de dénombrement d’UFC, la PCRq et la RT-PCRq nécessitent en amont une étape de décrochage des biofilms, source de biais. De plus, ces méthodes nécessitent généralement une étape d’extraction des ADN ou ARN en amont de la PCRq. Cette étape intermédiaire supplémentaire apporte donc de nouveaux biais potentiels (Smith et Osborn 2009). Ces méthodes offrent par contre les avantages d’être plus rapides et moins fastidieuses que le dénombrement d’UFC et sont également applicables à des biofilms formés sur des surfaces biotiques (Benoit *et al.* 2015 ; Okabe *et al.* 2012).

Méthode par quantification automatique sur images de microscopie

La microscopie confocale permet de capturer des images de biofilms hydratés en trois dimensions. Couplée à l'utilisation de marqueurs fluorescents spécifiques, cette méthode est très adaptable en fonction de l'information désirée, puisqu'il est alors possible de choisir le type de cellule à visualiser et donc à quantifier. Ainsi il est par exemple possible de visualiser l'ensemble des bactéries (viables et mortes) en utilisant un marqueur spécifique de l'ADN¹. L'utilisation d'un marquage de type « LIVE/DEAD »² permet quant à lui de discriminer les bactéries viables des bactéries mortes dans le biofilm (Cerca *et al.* 2012 ; Guilbaud *et al.* 2015). Aussi, il est possible de visualiser directement les bactéries actives en utilisant des souches bactériennes modifiées pour produire une protéine fluorescente³. L'utilisation de la microscopie offre également l'avantage de ne pas nécessiter d'étape de décrochage, puisque le biofilm est quantifié directement sur son support. Ceci permet d'éviter des biais mais également de fournir des informations quant à la répartition des biofilms sur leurs supports. Une des limitations majeures de l'utilisation de cette méthode concerne l'étape de quantification elle-même. Le nombre de cellules à dénombrer sur les images étant bien trop élevé pour un comptage manuel, il est nécessaire de passer par des méthodes de quantification automatique. Plusieurs logiciels tels que COMSTAT, ISA3D ou ImageJ permettent aujourd'hui de réaliser une quantification automatique via des méthodes de segmentation d'objets. Cependant, dans les zones de densité cellulaire élevée⁴ la qualité de segmentation est souvent diminuée (Schmitz *et al.* 2014), et des étapes de post-traitements sont alors nécessaires (Lepanto *et al.* 2014). Enfin, la quantification automatique sur image de microscopie peut être difficile à appliquer sur des surfaces fongiques en raison du développement en trois dimensions des réseaux d'hyphes. Toutefois, la méthode présentée au chapitre précédent permet justement de palier à ce problème en permettant la génération de colonies fongiques particulièrement fines.

1. eg. 4',6-diamidino-2-phénylindole (DAPI)

2. Un marquage « LIVE/DEAD » combine l'utilisation de deux marqueurs spécifiques de l'ADN, l'un ne passant pas au travers des membranes cellulaires

3. eg. GFP, RFP, mCherry.

4. Comme c'est le cas dans un biofilm.

5.1.2 Stratégie adoptée pour la quantification des biofilms de BBc6 sur les hyphes de *L. bicolor*

Parmi les méthodes décrites dans la littérature, trois semblent envisageables pour la quantification de biofilms sur surface fongique : Le dénombrement d'UFC, la PCRq et la microscopie. Les deux premières (UFC et PCRq) sont des méthodes de quantification indirectes puisqu'elles vont nécessiter en amont une étape de décrochage des biofilms et qu'elle ne permettent pas de quantifier directement les cellules constituant le biofilm. En effet, dans un cas c'est le nombre d'UFC à partir des biofilms décrochés qui est quantifié, et dans l'autre la présence d'un gène de référence de BBc6 (ou de son transcrit) au sein de ces derniers. Cet aspect indirect pouvant être source de nombreux biais, la méthode de quantification automatique sur image de microscopie, qui permet une quantification des biofilms directement sur leur support, semble plus adaptée. D'autant plus que la méthode présentée au chapitre précédent, permet de générer des images de microscopie de haute qualité à une échelle moyenne⁵. Ainsi, la quantification automatique pouvant être réalisée sur une portion importante de la colonie fongique, des biais dus à une hétérogénéité de répartition sont évités (Neu et Lawrence 2015). Toutefois, cette méthode n'a jamais été utilisée pour quantifier des biofilms sur des hyphes, et l'analyse des images nécessite des étapes de post-traitement pour lesquels il n'existe pas de protocole « standard ». Il sera donc nécessaire de développer un protocole pour l'analyse des images dont l'efficacité devra par la suite être validée. Pour cette raison il est nécessaire de disposer de plusieurs méthodes de quantification ce qui va permettre de comparer les résultats obtenus et également de bénéficier de la complémentarité des informations apportées. Il a donc été décidé de tester l'application des trois méthodes. Les biofilms ont été formés selon le même protocole que précédemment (chapitre 4), puis des essais de quantification par dénombrement d'UFC, PCRq et microscopie ont été réalisés.

5. De l'ordre du mm.

5.2 Essais de deux approches indirectes pour la quantification de biofilms sur des hyphes

5.2.1 Description des protocoles testés

Des essais de quantification par dénombrement d'UFC ou par PCRq ont été réalisés sur des biofilms formés par la souche BBc6R8⁶ sur des colonies de *L. bicolor*, préalablement décrochés par agitation au vortex. Le support utilisé ici étant vivant, ce qui implique des variations de poids et de volumes entre les réplicats, il était nécessaire de quantifier également le champignon afin d'exprimer les résultats par rapport à une quantité de champignon. Après le décrochage des biofilms par vortex, les colonies fongiques ont donc été séchées puis pesées.

Pour la méthode de culture classique, après décrochage des biofilms, des dilutions des suspensions bactériennes obtenues ont été réalisées. Puis, les nombres d'UFC ont été estimés après étalement sur milieu de culture gélosé. Pour la quantification par PCRq, Les suspensions bactériennes obtenues après le décrochage des biofilms ont été centrifugées, puis les culots obtenus ont été placés à 90 °C afin de lyser les cellules. Une PCRq ciblant un gène de référence (*selR*; Galet *et al.* 2015) a alors été réalisée directement, sans étape d'extraction d'ADN. Afin d'exprimer les résultats en ng d'ADN de BBc6R8, la relation entre la quantité de ce gène et la quantité d'ADN total a été estimée via l'utilisation d'une gamme étalon d'ADN génomique de BBc6R8. Les détails des protocoles sont donnés en page 177 et 178.

5.2.2 Résultats et discussion

Les résultats des deux méthodes, présentés en figure 5.1 correspondent à deux temps de formation de biofilms, un temps précoce ($T1 = 1$ h) et un temps tardif ($T2 = 14$ h pour les UFC et 16 h pour la PCRq). Si pour les deux méthodes, la différence observée entre $T1$ et $T2$ peut être considérée comme significative par

6. La souche BBc6R8 correspond à un mutant spontané résistant à la rifampicine de la souche d'origine BBc6

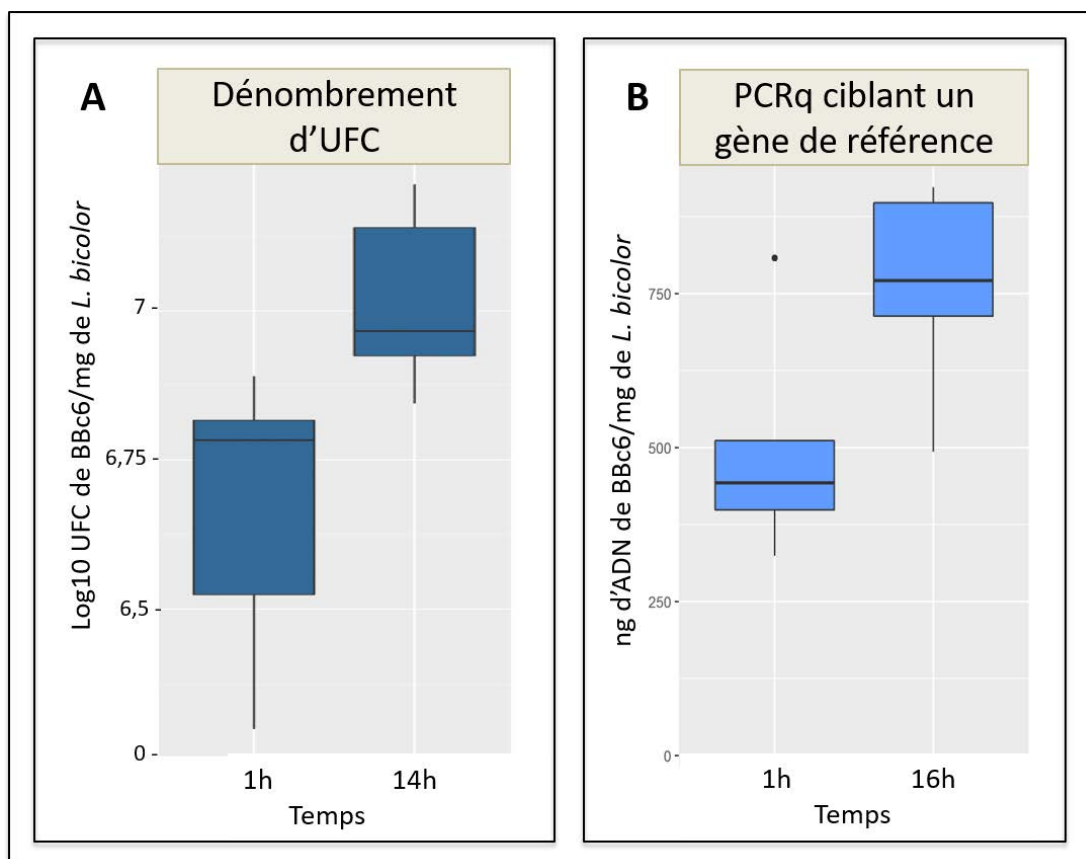


Figure 5.1 – Test de quantification des biofilms par dénombrement d'UFC et PCRq
A) Dénombrement d'UFC à partir des suspensions de biofilms formés par BBc6R8 sur les colonies de *L. bicolor*, pour 6 réplicats biologiques. B) Analyse PCRq à partir des suspensions de biofilms formés par BBc6R8 sur les colonies de *L. bicolor*, pour 5 réplicats biologiques.

un test anova⁷, cette différence est très faible (inférieure à un facteur 2), ce qui ne correspond pas à ce qui avait été observé précédemment par microscopie (fig.4.3, p.53). De plus la variabilité entre les réplicats biologiques semble importante, particulièrement dans le cas des UFC où les valeurs entre certains réplicats varient du simple au double. Enfin, pour les deux méthodes, une variabilité importante a également été observée entre les différents essais réalisés⁸ ce qui pointe un manque de reproductibilité.

La variabilité observée peut, de façon non exclusive, refléter une réelle variabilité biologique ou résulter de biais inhérents aux méthodes employées. Il semble en tous cas clair, par comparaison aux résultats obtenus par microscopie, que ces méthodes⁹ conduisent à une forte sous-estimation de la densité bactérienne de biofilms tardifs.

Dans le cas de la méthode des UFC, cette sous-estimation ainsi que la forte variabilité pourraient être en partie expliquées par la présence de bactéries VMNC (cf. 5.1.1, page 64). En effet, il est probable que ce type de bactéries était présent, et potentiellement en quantité importante dans les biofilms formés par BBc6R8, puisqu'aucune source de carbone n'était présente dans le milieu de formation des biofilms¹⁰. Il est donc probable qu'à T2, une portion importante de bactéries viables mais en état de carence n'ait pas formé de colonies. De plus il est envisageable que la forte agitation par vortex utilisée pour le décrochage des biofilms ait compromis la viabilité d'une partie des cellules, apportant ainsi un biais supplémentaire. Enfin, des observations au microscope des suspensions de biofilms décrochés ont révélé la présence d'agrégats (données non montrées). L'agitation au vortex a donc permis de décrocher les biofilms de leurs supports mais pas de les décomposer, ainsi de nombreuses cellules sont restées en agrégats, incluses dans des morceaux de matrice. Ceci va apporter un biais important car il est alors impossible d'homogénéiser la suspension correctement et de tels agrégats ne vont former qu'une seule UFC (Freitas *et al.* 2014).

7. $p = 0.0125$ pour les UFC et $p = 0.0496$ pour la PCRq.

8. Données non montrées.

9. Du moins tel qu'elles ont été appliquées.

10. Aucune source de carbone n'a été ajoutée, cependant des éléments carbonés sécrétés par *L. bicolor* (Deveau *et al.* 2010 ; Cumming *et al.* 2001) sont probablement présents dans le milieu.

Dans le cas de la PCR_q, la faible différence entre $T1$ et $T2$ est d'autant plus surprenante puisque cette méthode ne distingue pas les bactéries mortes des vivantes. On s'attend donc à une différence encore plus importante que celle observée par microscopie lorsque seule les bactéries produisant de la GFP sont visualisées (fig.4.3, p.53). Cette sous-estimation pourrait s'expliquer par le fait que la PCR_q a été réalisée sans étape d'extraction d'ADN préalable. En effet, si procéder sans étape d'extraction d'ADN permet d'éviter les biais inhérents à cette étape supplémentaire et rend l'analyse plus rapide, le risque de la présence d'inhibiteurs de PCR est alors important. D'autant plus que comme dit précédemment, après l'étape de décrochage au vortex de nombreuses cellules dans la suspension sont restées incluses en agrégats dans des morceaux de matrice. La présence de composés de la matrice aurait ainsi pu gêner l'amplification PCR. De ce fait, le peu de différences entre $T1$ et $T2$ pourrait s'expliquer par le fait qu'à $T2$ les matrices sont plus abondantes qu'à $T1$, l'amplification serait donc davantage gênée. Enfin, la présence d'agrégats a également pu gêner l'homogénéisation des échantillons avant la PCR_q.

5.3 Développement d'une méthode de quantification directe par microscopie

5.3.1 Description de la méthode employée

Des images des biofilms de 16h de BBc6 (marquée GFP) sur des colonies fongiques ont été obtenues selon le même protocole que celui utilisé précédemment (chapitre 4) mais avec une distance entre deux coupes optiques inférieure. En effet, il est ici indispensable que la distance choisie soit inférieure à la largeur minimum d'une cellule de BBc6 afin de ne pas omettre de bactéries contenues entre deux coupes optiques. La valeur minimum de largeur observée des cellules de BBc6 se situant aux alentours de $0.8\mu\text{m}$, une distance de $0.5\mu\text{m}$ a donc été utilisée entre les coupes. Les images ont ensuite été analysées à l'aide du logiciel libre FIJI¹¹.

11. FIJI Is Juste ImageJ (Schindelin *et al.* 2012)

La quantification des bactéries a été effectuée sur le canal ne contenant que ces dernières¹², selon le protocole suivant :

Pré-traitement : Lorsque nécessaires, des étapes de pré-traitement ont été réalisées afin d'améliorer la qualité des images en augmentant les signaux pertinents et/ou en diminuant les signaux parasites (bruit de fond). Ces étapes ont été respectivement réalisées à l'aide de la fonction de correction de gamma et l'outil « remove background » du logiciel FIJI.

Traitement : Pour le traitement de l'image, l'outil « 3D object counter » (Bolte et Cordelieres 2006) a été utilisé. Cet outil va tout d'abord permettre une segmentation de l'image. Cette étape est requise pour toute méthode de quantification automatique sur image. Elle consiste à partitionner l'image en régions distinctes qui constituent alors des objets en trois dimensions. Dans notre cas, les objets d'intérêts sont les bactéries. L'outil va également fournir les statistiques des objets détectés (volumes, aires, nombre total d'objets...), ainsi qu'une carte représentant les objets qui ont été comptabilisés (fig. 5.2).

Post-traitement : Pour obtenir une estimation correcte du nombre de bactéries présentes sur l'image analysée, et ce malgré la présence de zones denses ne pouvant être segmentées, une approche semi-statistique basée sur l'estimation du volume moyen des bactéries a été utilisée. L'hypothèse selon laquelle la majorité des objets correspondent à des bactéries isolées a été considérée. En effet, même si chaque agrégat peut contenir une quantité importante de bactéries, puisqu'ils sont détectés comme un seul objet, il est probable que leur nombre soit nettement inférieur au nombre de bactéries isolées. Ceci semble confirmé par la distribution des volumes de l'ensemble des objets détectés qui est monomodale (fig. 5.3), alors que la taille des agrégats est hétérogène. Le mode de la distribution des volumes des objets a donc été utilisé comme estimateur du volume de référence (v_r). Cette valeur modale a été calculée après avoir retiré des données les valeurs de volume inférieur à $0.2\mu\text{m}^3$ (fig. 5.4) afin d'éviter une sous-estimation de v_r due à une quantité importante de petits objets correspondant à des artefacts et pouvant influencer de façon importante la valeur modale. Les objets détectés

12. Dans notre cas, le canal vert

ont ensuite été répartis en 3 catégories :

Soit $v_{min} = v_r - \frac{v_r}{2}$, $v_{max} = v_r + \frac{v_r}{2}$

- Catégorie A : n_a objets de volumes v_a pour lesquels $v_{min} \leq v_a \leq v_{max}$
- Catégorie B : n_b objets de volumes v_b pour lesquels $v_b > v_{max}$
- Catégorie C : n_c objets de volumes v_c pour lesquels $v_c < v_{min}$

Ainsi, les objets de catégorie A correspondent aux bactéries isolées pour lesquelles la segmentation a fonctionné; les objets de catégorie B, qui ont donc une taille supérieure à v_{max} , correspondent aux agrégats de bactéries; et les objets de catégorie C, dont la taille est inférieure à v_{min} correspondent à des artefacts dus à un bruit de fond résiduel. Il est important de noter que l'intervalle $\left[v_r - \frac{v_r}{2}; v_r + \frac{v_r}{2}\right]$ a été choisi de façon arbitraire. Pour d'obtenir une estimation plus précise il serait nécessaire de faire une étude approfondie de la variabilité de la taille des cellules, afin de choisir l'intervalle avec *a priori* plutôt que de façon arbitraire. Une fois les objets classés en catégories, ceux de la catégorie A ne sont pas modifiés, les volumes des objets de la catégorie B sont divisés par v_r afin d'obtenir l'estimation du nombre de bactéries qu'ils contiennent, et ceux de la catégorie C sont éliminés. Ainsi la valeur estimée du nombre total de bactéries est donnée par :

$$n_t = n_a + \sum_{i=1}^{n_b} \frac{v_{b_i}}{v_r} + 0 \times n_c$$

5.3.2 Résultats et discussion

Sur la figure 5.2 est représentée l'image sur laquelle la méthode a été appliquée (fig. 5.2.a) ainsi que la carte des objets détectés correspondante (fig. 5.2.b). La méthode a par ailleurs été appliquée à deux sous-parties de l'image contenant soit une faible soit une forte densité de bactéries, qui sont également représentées sur la figure 5.2(c-f). Les résultats de la quantification automatique pour les différentes zones, avec ou sans post-traitement, sont indiqués dans le tableau 5.1. Concernant la zone de faible densité, une quantification manuelle a également été réalisée.

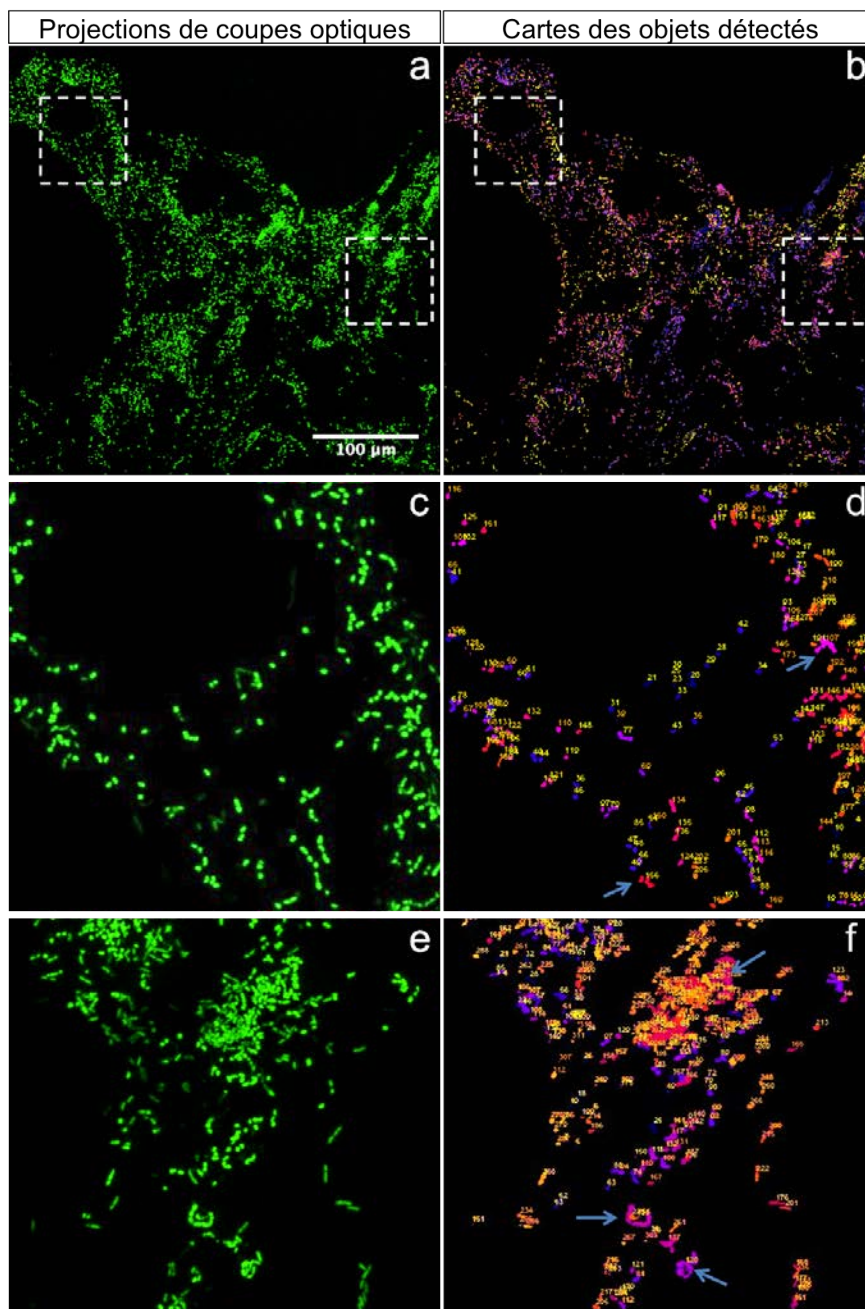


Figure 5.2 – Test de la méthode de quantification automatique

a) Projection du canal vert de coupes de microscopie confocale d'un biofilm de 16h de BBc6-*gfp* ; c) zoom dans une région peu dense de a) ; e) zoom dans une region dense de a). Les cartes des objets détectés fournies par l'outil « 3D object counter » (ImageJ) après segmentation de a), c) et e) sont respectivement en b), d) et f). Les agrandissements sont indiquées par des rectangles blancs sur a) et b). Les flèches bleues indiquent des agrégats pour lesquels la segmentation a échoué.

	Sans post-traitement		Avec post-traitement	Comptage manuel
	Effectif	Volume moyen	Effectif	Effectif
Image entière	4620	1.56	8514	NA
Densité faible	191	1.29	282	272
Densité élevée	250	1.94	572	NA

Table 5.1 – Résultats obtenus par quantification automatique

Les résultats obtenus avec ou sans étape de post-traitement sont indiqués pour l'image entière (5.2.a) et ses deux sous parties (peu dense : 5.2.c et dense : 5.2.e). La valeur obtenue avant post-traitement a été calculée avec l'outil « 3D counter object » du logiciel ImageJ. La valeur du volume de référence utilisé pour le post-traitement est celui calculé sur l'image entière ($v_r = 0.83$, cf. fig.5.4). Concernant la zone de faible densité, un comptage manuel a également été effectué. Les volumes moyens des objets détectés après l'étape de segmentation (sans post-traitement) sont également indiqués.

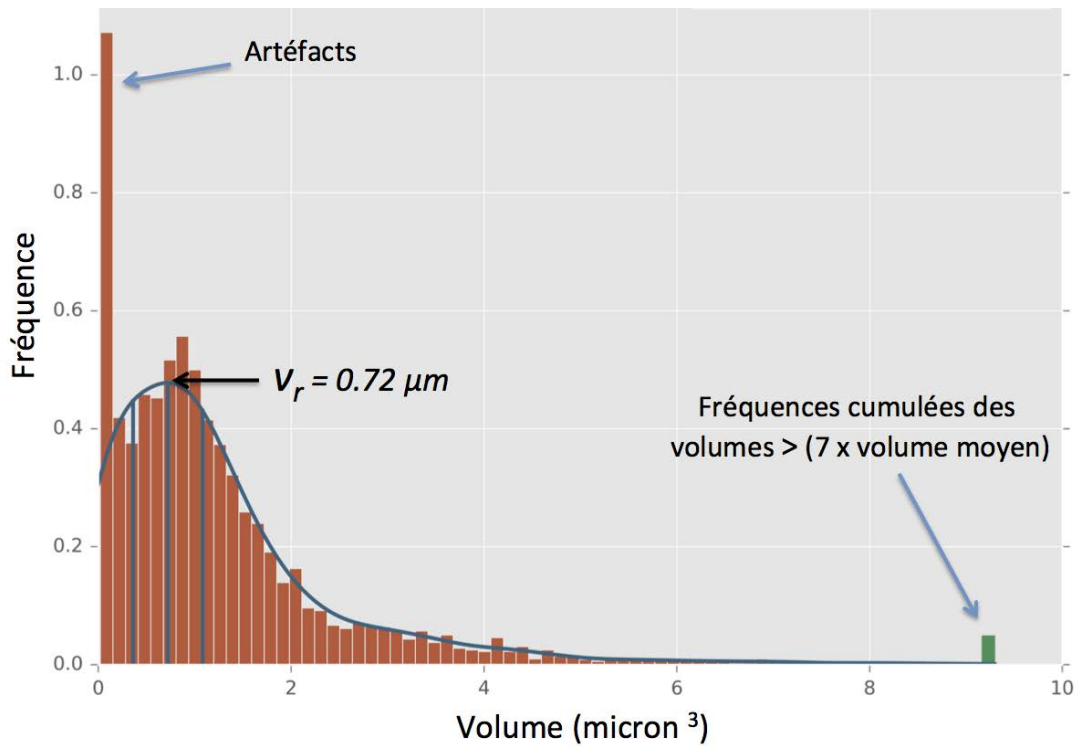


Figure 5.3 – Courbe de répartition des volumes des objets détectés après la segmentation de l'image

La valeur modale calculée pour être le volume de référence (v_r) est indiquée. Pour rendre la figure plus lisible les fréquences des volumes supérieurs à 7 fois le volume moyen ont été cumulées (barre verte). Une fréquence élevée d'objets de petits volumes correspondant à des artefacts est observée et est également indiquée.

En l'absence de post-traitement, les résultats ont confirmé l'inefficacité de la segmentation lorsque les bactéries sont agrégées. En effet, sur la carte des objets détectés dans la zone de forte densité, de nombreux objets correspondent en fait à des agrégats de bactéries¹³. De plus, même lorsque la densité est faible, la présence de petits agrégats (2 à 3 bactéries) va fortement biaiser les résultats puisque la valeur obtenue par comptage manuel sur la zone de faible densité (272) est 1.4 fois supérieure à celle obtenue par calcul automatique sans post-traitement (191) (tab. 5.1). Ceci confirme que sans étape de post-traitement, la valeur de quantification obtenue aura tendance à être sous-estimée, et ce probablement d'autant plus que la densité sera élevée. Afin de remédier à ce problème, une étape de post-traitement a donc été ajoutée dans le but d'estimer le nombre de bactéries contenues dans les agrégats.

L'étape de post-traitement semble améliorer nettement les résultats de la quantification (tab. 5.1). En effet, dans la zone de densité faible la valeur obtenue après post-traitements (334) est très proche de la valeur qui avait été obtenue par quantification manuelle (272). Bien qu'il soit impossible de le confirmer par quantification manuelle, les résultats de la quantification automatique pour la zone de forte densité apparaissent également plus cohérents après post-traitement (tab. 5.1). Bien que très préliminaires, ces résultats sont donc encourageants. La prochaine étape sera d'appliquer cette méthode pour comparer les résultats entre un biofilm précoce et un biofilm tardif. Toutefois, le chemin à parcourir pour l'obtention d'une méthode optimisée et sa validation est encore long. Tout d'abord, il est impossible, même pour un microbiologiste expérimenté, de distinguer à l'œil les frontières entre les cellules aux seins d'agrégats denses, ce qui empêche toute quantification manuelle dans les zones de forte densité. Il n'est donc pas possible pour l'instant de vérifier l'efficacité de la méthode. Il semble donc indispensable de trouver une autre méthode de quantification qui soit validée (par exemple UFC ou PCRq), pour pouvoir en comparer les résultats avec ceux obtenus par quantification automatique. De plus, même si la méthode de quantification des bactéries était au point, les effectifs bactériens obtenus seraient inexploitable si ils ne peuvent pas être ramenés à une quantité d'hyphe. Or, je ne suis pour l'instant

13. Certains agrégats sont indiqués par des flèches bleues sur la figure 5.2

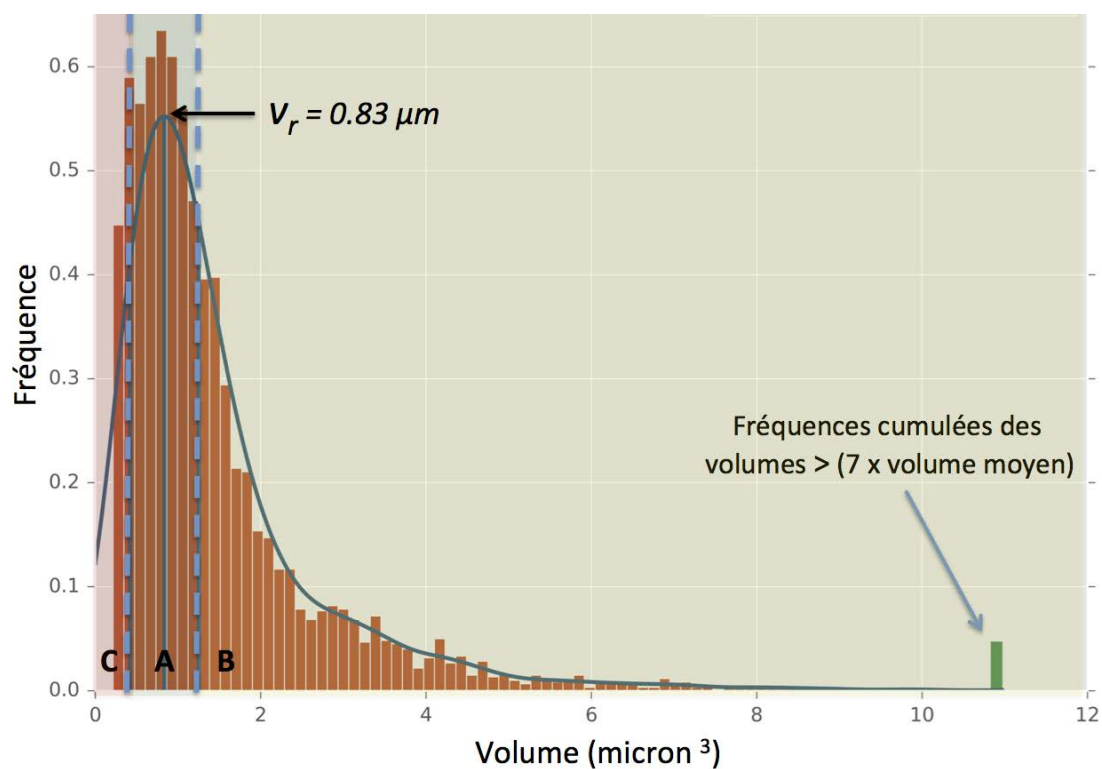


Figure 5.4 – Courbe de répartitions des volumes des objets détectés sans les artefacts
 Courbe de répartitions des volumes des objets détectés après avoir éliminé les objets de volumes inférieurs à $0.2 \mu m^3$, qui correspondent à des artefacts. La valeur modale obtenue (0.83) sera utilisée comme volume de référence (v_r) pour les tests présentés dans ce chapitre. Les catégories des objets (A, B et C) définies selon les critères indiqués page 73 sont indiquées sur la figure.

pas parvenue à trouver une méthode efficace pour déterminer la longueur total du réseau d'hyphes présent sur une image. Enfin, il convient de garder à l'esprit que dans tous les cas cette méthode ne permettra qu'une quantification absolue du nombre de cellules. Il restera donc à estimer la marge d'erreur inhérente afin de savoir à partir de quel facteur des échantillons peuvent être considérés comme significativement différents.

5.4 Conclusions et perspectives concernant la quantification de biofilms formés sur hyphes

Permettant d'éviter de nombreux biais, la méthode de quantification automatique par microscopie pourrait être particulièrement avantageuse et les résultats préliminaires obtenus sont encourageants. Toutefois, deux aspects empêchent pour l'instant d'aller plus loin dans le développement de cette méthode. Tout d'abord, il est indispensable de trouver une méthode de quantification automatique des hyphes. Le volume total du réseau d'hyphe pourrait être déterminé de la même façon que pour les bactéries, mais il ne fait pas un bon estimateur car le marquage des hyphes est généralement hétérogène. En effet, l'intensité du marquage peut beaucoup varier d'un hyphe à l'autre ce qui risquerait donc de biaiser fortement l'estimation du volume du réseau d'hyphes. Il serait donc nécessaire de considérer la longueur du réseau d'hyphes, ce qui nécessite l'utilisation de méthodes avancées de traitement d'image. Une autre solution serait d'utiliser des systèmes de micro-fluidique. Avec ce type de système il est possible de faire croître les hyphes fongiques à l'intérieur de canaux très fins et d'y injecter ensuite une suspension bactérienne pour la formation de biofilms. Il est dans ce cas beaucoup plus simple de quantifier les hyphes car ces derniers sont alors isolés et en petite quantité.

Le second aspect limitant le développement d'une méthode de quantification automatique est la nécessité de posséder une seconde méthode de quantification afin de pouvoir valider la méthode développée. Or, les résultats obtenus pour l'instant avec les deux méthodes de quantification indirectes (UFC et PCRq) n'ont pas été concluants. Des ajustements des protocoles utilisés sont nécessaires afin d'ob-

tenir des résultats représentatifs et reproductibles. Pour l'emploi des méthodes indirectes la présence de matrice pourrait être un des facteurs de biais majeurs, il semble donc impératif de trouver un moyen de l'éliminer. Nous verrons dans le chapitre suivant que les biofilms de BBc6 sont décomposés par un traitement à la DNase¹⁴, concernant la méthode des UFC, une solution pourrait donc être de traiter les biofilms à la DNase avant l'ensemencement des milieux. De plus cela pourrait éviter l'utilisation du vortex qui est source de biais. En effet, associée au traitement DNase, une agitation douce pourrait suffire pour à la fois décrocher les biofilms des hyphes et également les décomposer. Il reste toutefois à s'assurer que le traitement DNase n'influe pas sur la viabilité des cellules. Le nombre de bactéries VMNC potentielles, lui aussi source de biais, pourrait être diminué en ajoutant une source de carbone dans le milieu de formation des biofilms. La PCRq quant à elle pourrait être particulièrement intéressante, car ne nécessitant pas de conserver la viabilité des cellules, il serait envisageable de réaliser la quantification automatique et la PCRq sur le même échantillon. En effet, après avoir été imagé, l'échantillon pourrait être récupéré en grattant la lame de microscopie pour être utilisé pour une quantification par PCRq. Puisqu'avec cette méthode l'élimination de la matrice via un traitement DNase serait quelque peu problématique, une centrifugation dans du chlorure de sodium concentré pourrait être envisageable, cette méthode s'étant montrée efficace pour extraire les cellules des matrices de biofilms de *Staphylococcus aureus* (Chiba *et al.* 2015). Une extraction d'ADN pourrait ensuite être réalisée sur les cellules extraites. Toutefois, un biais à considérer quant à l'utilisation de la PCRq est l'amplification de l'ADN des bactéries non viables ainsi que la potentielle amplification de l'ADN extracellulaire (ADNe) qu'on sait présent en quantité importante dans les matrices des biofilms. Pour éliminer ces biais il serait possible d'utiliser une méthode basée sur l'amplification sélective de l'ADN des cellules viables tel que le traitement des biofilms au Propidium Monoazide (PMA)¹⁵ avant l'étape de lyse (Tavernier et Coenye 2015). Toutefois l'efficacité de cette méthode reste controversée puisque cette molécule est soupçonnée de nuire à la viabilité des cellules, conduisant à une

14. Enzyme catalysant la dégradation des acides désoxyribonucléiques.

15. Agent fluorescent intercalant de l'ADN ne traversant pas les membranes des bactéries viables et ayant la particularité d'inhiber l'amplification des brins d'ADN dans lesquels il est intercalé.

forte sous-estimation de la quantité de cellules viables (Taylor *et al.* 2014 ; Barbaupiednoir *et al.* 2014). Pour cette raison, il pourrait être préférable de quantifier une séquence ARN de référence (par exemple ARNr 16S¹⁶), en passant par une RT-PCRq. En plus d'éviter les biais précédemment cités, en permettant la quantification sélective des bactéries actives dans les biofilms, cela pourrait permettre de traiter en amont les échantillons à la DNase afin de dissoudre la matrice. Enfin, une autre façon de valider la méthode de quantification automatique sans passer par l'utilisation d'une seconde méthode de quantification serait d'utiliser une méthode de modélisation de biofilms (Klinger-Strobel *et al.* 2016). Ainsi il serait possible de créer des images avec un nombre connu de bactéries et de vérifier le résultat obtenu par quantification automatique.

Beaucoup d'ajustements restent donc à effectuer pour parvenir à une méthode de quantification robuste. Ce projet de quantification ayant été commencé tardivement dans le parcours de cette thèse, il n'a pas pu être mené à terme. Toutefois, ces premiers résultats exploratoires ont permis d'identifier les aspects critiques des méthodes testées, permettant ainsi de proposer des ajustements. De plus, bien qu'il soit certainement très perfectible, et qu'il nécessite le développement d'une méthode de quantification des hyphes, le protocole développé pour la quantification automatique des bactéries semble prometteur.

16. ARN ribosomique constituant la petite sous-unité des ribosomes des procaryotes

Troisième partie

Résultats

Chapitre 6

Analyse générale qualitative de la formation de biofilms bactériens sur les champignons du sol

6.1 Introduction

La méthode d'analyse qualitative présentée dans le chapitre 4 a été appliquée afin de répondre à certains objectifs de cette thèse, à savoir la description de l'interaction physique entre BBc6 et *L. bicolor*, ainsi que l'étude de sa spécificité. Ces analyses ayant fourni de nombreux résultats intéressants, une publication rassemblant ces derniers a été rédigée et est présentée dans la deuxième section de ce chapitre. Elle sera soumise prochainement à la revue ISME. la troisième section quant à elle présente des réflexions et résultats complémentaires qui permettent d'aller plus loin concernant certains des aspects présentés dans la publication.

Remarque : Les figures de la publication présentée en section 2 apparaissent avec le numéro du chapitre (6) ajouté à la numérotation utilisée dans la publication. Les figures supplémentaires (fig. S1 et S2) sont incluses à la fin de la publication.

6.2 Bacterial biofilm formation on soil fungi : a widespread ability under controls

Cora Miquel-Guennoc^{1,2}, Jessy Labbé², Christophe Rose³, Francis Martin¹,
Aurélien Deveau^{1*}

¹ INRA Université de Lorraine, Interactions Arbres-Microorganismes, UMR 1136, Champenoux,
F-54280, France

² Biosciences Division, Oak Ridge National Laboratory, Oak Ridge, TN 37831, USA

³ INRA Université de Lorraine, Écologie et Écophysiologie Forestière, UMR 1137, Champenoux,
F-54280, France

Abstract

Although bacterial biofilms are ubiquitous, little is known about their occurrence and their involvement in bacterial/fungal interaction in soil. In order to contribute to fill this gap, we first combined confocal and electronic microscopy to describe the structure, distribution and dynamic of *in vitro* biofilm formation by the soil bacteria *Pseudomonas fluorescens* BBc6 on the hyphae of the ectomycorrhizal fungi *Laccaria bicolor*. Secondly, we studied the specificity of this physical interaction and show that the ability to form biofilms on fungal hyphae is widely shared among soil bacteria. In contrast, some fungi, mainly belonging to the Ascomycete class, did not allow the formation of bacterial biofilms on their surfaces. Concerning BBc6, the formation of biofilms was also strongly modulated by the presence of tree roots and by the development of the ectomycorrhizal symbiosis, suggesting that biofilm formation does not occur randomly in soil but that it is highly regulated by several biotic factors. All the biofilms formed on fungal hyphae were structured by dense networks of DNA containing filaments. Those filaments were essential for the formation and the structural maintenance of the biofilms and were produced by both gram positive and negative bacteria. Our data coupled to those produced by other groups strongly suggests that DNA is not only a universal coding molecule but that it is also widely used by prokaryotes and eukaryotes as a structural molecule.

Keywords : biofilm, eDNA, ectomycorrhizal symbiosis, soil fungi, fungal/bacteria interactions

6.2.1 Introduction

Soil fungi and bacteria are major drivers of organic matter degradation and nutrient cycling (Schimel and Schaeffer, 2012; Gougoulas *et al.*, 2014). In addition, soil fungi and bacteria continuously interact positively and/or negatively with their biotic environment and particularly with plant roots that provide them with nutrients. Hence, by forming mutualistic or pathogenic associations with plant roots, these micro-organisms have an important impact on plant growth and development (Van Der Heijden *et al.*, 2008; Philippot *et al.*, 2013).

Fungi and bacteria often share the same habitat and resources and have consequently many opportunities to interact through competition, cooperation or antagonism (Frey-Klett *et al.*, 2011). Therefore, they have a reciprocal influence on their individual functioning, community structures and composition. Bacterial/fungal interactions are mediated by a wide variety of mechanisms that, not necessarily but often, include physical interactions. Among those, bacterial biofilm formation on fungi is a frequent phenomenon that allows or enhances numerous bacterial/fungal interaction processes (Hogan *et al.*, 2007), as synergistic degradation of substrates (Herath *et al.*, 2014; Seneviratne *et al.*, 2006) or bacterial antagonism against fungi (Bolwerk *et al.*, 2003, Hover *et al.* 2016). Biofilm is a major bacterial mode of life in which bacterial cells form aggregated communities attached to biotic or abiotic surfaces and are embedded in an extracellular polymeric matrix constituted by secreted polysaccharides, proteins, lipids and DNA (Kjelleberg and Givskov, 2007; Flemming *et al.*, 2016). Their formation is a dynamic process starting by cell adhesion, followed by colony formation and extracellular matrix production, leading to a thick mature biofilm from which some cells detach to colonize new places.

Due to the numerous advantages conferred by the biofilm mode of life itself and those inherent to settlement on fungal hyphae, it is likely that bacterial biofilms on fungal hyphae are widespread in soil ecosystems. Indeed, the biofilm mode of life offers resistances against predation (Nadell *et al.*, 2015; DePas *et al.*, 2014; Matz *et al.*, 2005), desiccation (Türetgen *et al.*, 2007; van de Mortel *et al.*, 2004), antimicrobial (Davies, 2003, Balbontin *et al.* 2014) and toxic compounds (Koe-

chler *et al.*, 2015) and allows organization in functional communities (Jefferson, 2004). Moreover, strong physical and chemical variations occurring in the soil are buffered in biofilms, as they form isolated micro-environments (Burmølle *et al.*, 2012). Finally, settling on fungal hyphae allows for the use of hyphae as vectors for bacterial transport (Warmink *et al.*, 2011; Simon *et al.*, 2015; Stopnisek *et al.* 2016) and provides the trophic benefits of fungal mineral weathering (Finlay, 2008) and nutrients release (Nazir *et al.*, 2010; Warmink and van Elsas, 2009; Burmølle *et al.*, 2012). Pioneering works on arbuscular mycorrhizal fungi (AMF) indicated that certain bacterial species preferentially colonize hyphae of the AMF *Rhizophagus intraradices* and *Glomus* sp. (Bianciotto *et al.*, 1996, Toljander *et al.*, 2005, Scheublin *et al.*, 2010). Few other studies explored the formation of bacterial biofilm on hyphae (Warmink *et al.*, 2011, Stopnisek *et al.*, 2016) but these studies were restricted to some model systems and our understanding of the real extent of bacterial biofilm formation on hyphae in soils remains limited (Burmølle *et al.*, 2012). In addition, the structure and the dynamic of the formation of bacterial biofilms on hyphae have not been described yet and it is unknown whether bacterial biofilm formation on hyphae occurs in a similar way than on abiotic surfaces. Yet, their potential implications in numerous beneficial and detrimental fungal/bacterial interactions and their potential prevalence in soil ecosystems, make their study essential for understanding bacterial/fungal interactions in soils. To fill these gaps, we combined new generation confocal microscopy (LSCM) and scanning electron microscopy (SEM) to finely describe the process of formation of bacterial biofilm on fungal hyphae. In a first step, we used an ectomycorrhizal fungus (*Laccaria bicolor* S238N, Martin *et al.*, 2008) and its associated mycorrhiza helper bacterium (*Pseudomonas fluorescens* BBc6, Garbaye & Duponnois 1989) as model organisms since ectomycorrhizal fungi are key players of soil forests through the symbiosis they establish with tree roots (Smith & Read 2008) and are known to interact with numerous bacteria (Bonfante & Anca 2009). Then we evaluated the impact of the root system and the ectomycorrhizal symbiosis on the fate of the physical interaction between the two model organisms. Lastly, we extended the study to a larger number of soil fungal and bacterial strains with various ecological traits and taxonomic origin to investigate the degree of specificity of the interaction.

6.2.2 Material and methods

Microbial strains and culture conditions

All the strains used in this study are listed in Table 1. A GFP-tagged version of *P. fluorescens* BBc6 (Deveau et al. 2010) was used to facilitate imaging. None of the other microbial strains used in this study constitutively expressed a fluorescent protein. Bacterial strains were maintained at -80°C in Luria-Bertani (LB) medium with 30% glycerol and were first grown on 10% TSA plates for 24 h (3 g L^{-1} tryptic soy broth from Difco and 15 g L^{-1} agar) at 28°C . Then, for each strain, 2 to 3 individual bacterial colonies were collected from TSA cultures to inoculate 25 mL of liquid LB medium and incubated at 28°C and 150 rpm until late exponential growth before their use for biofilms formation. Fungal cultures were maintained on P5 medium then transferred to P20 agar plates covered with EDTA pre-treated cellophane membranes as described by Miquel-Guennoc *et al.* (2016), except for *T. melanosporum* that was always kept on P20 medium.

In vitro biofilm formation on fungal hyphae and glass fibers

The method described step-by-step in Miquel-Guennoc *et al.* (2016) was used. Briefly, bacterial cultures in late exponential growth phases were spin down and washed once in potassium phosphate buffer (PPB, KH_2PO_4 25 g L^{-1} , K_2HPO_4 2.78 g L^{-1} , pH 5.8). Bacterial pellets were resuspended in PPB and the cell density was adjusted to 10^9 cfu/mL to prepare the bacterial inoculum. Five mL of this bacterial suspension was added to each well of 6 well microplates. Then, using sterile tweezers, 1 cm diameter fungal colonies grown on P20 agar plates were added to each well of the microplates together with the cellophane membranes on which they were growing to avoid harming fungal hyphae during the transfer. Plates were gently shake for 1 min to allow the fungus to unstick from the cellophane sheets and cellophane sheets were removed from each well. Microplates containing the bacterial inoculum and the fungal colonies were then incubated at 20°C and 60 rpm in an incubator for 16h, except as otherwise stated. To test the formation of bacterial biofilm on glass fibers, the same procedure was used

but fungal colonies were replaced by 10 μm diameter sterile glass fibers. For each treatment, two independent assays in triplicate were analyzed.

Sample preparation for confocal and electron microscopy imaging

The method used to prepare samples for imaging is described step-by-step in Miquel-Guennoc et al. (2016). Briefly, fungal colonies or glass fibers were transferred to a new microplate and rinsed samples with NaCl (17 g L^{-1}) and then with PPB to detach planktonic and electrostatically attached bacterial cells (Toljander *et al.*, 2006).

For confocal imaging, fungal colonies were cut in half with a razor blade and appropriate staining was performed before mounting the samples on slide with Fluoromount-G anti-fading (Fisher Scientific). All dyes were purchased from ThermoFisher Scientific. Fungal hyphae were stained with $10\text{ }\mu\text{g mL}^{-1}$ WGA Alexa Fluor 633 for 15 min. All bacteria, except *P. fluorescens* BBc6 that constitutively express GFP, were stained with $0.3\text{ }\mu\text{M}$ DAPI for 15 min. Several dyes were used to visualize matrix components : 1X SYPRO Ruby (15 min incubation), Red Congo (XX) and YY-lectins, DAPI, prodidium iodide ($1\text{ }\mu\text{g mL}^{-1}$, 15 min) or TO-PRO3 ($1\text{ }\mu\text{M}$, 15 min) were used to stain proteins, cellulose, and extracellular DNA (eDNA), respectively. Confocal imaging was performed with a LSM780 Axio Observer Z1 laser scanning confocal microscope (LSCM, CarlZeiss), equipped with 405, 488 and 633 nm excitation lasers and T-PMT and GaAsP PMT detectors, coupled to ZEN 2.1 lite black software (CarlZeiss). Images were captured with 10x 0.3 NA and 40x 1.2 NA objectives, using a combination of tile scan and Z stack functions. Data visualization was performed by 2D maximum intensity projection, using the “Z project” function from Fiji free software (Schindelin *et al.*, 2012, <http://fiji.sc/Fiji>).

For electron microscopy imaging, fungal colonies or glass fibers were first rinsed with NaCl (17 g L^{-1}) then with sterile water to avoid crystal formation during dehydration step. Then, samples were dehydrated by freeze-drying and coated with 2 nm of platinum (quartz measurement) under argon plasma (2.5×10^{-2} mbar, 35 mA) with a High Vacuum Coater Leica EM ACE600 (Leica). Coated samples

were imaged first with a scanning electron microscope (SEM) equipped with a Field Emission Gun (SIGMA-HPSEM-FEG, Zeiss) using high resolution “in lens” detector at 1 kV of accelerating voltage. In a second step, some samples (biofilms grown on glass fibers) were placed in a second SEM (LEO 1450VP W-SEM, Zeiss) to perform EDS micro-analysis and mappings of elements (20 kV of accelerating voltage at 1 nA of sample current ; Oxford-Instruments INCA MAPS software).

Biofilm formation in the presence of Poplar tree roots and ectomycorrhizae

Micro propagated hybrid poplar (*Populus tremula* × *Populus alba* ; INRA clone 717-1-B4) were used to form mycorrhiza with *L. bicolor* S238N by the method of “*in vitro* sandwich co-culture system” developed by Felten *et al.* (2009). Briefly, plant stem cuttings from *in vitro* poplar plants were precultured on half-strength MS medium containing 2 mg L⁻¹ indole butyric acid for 7 days. Rooted cuttings were then transferred to vertically arranged 12- × 12-cm square petri dishes half covered with a cellophane membrane and cultured for 3 weeks under a 16 h d⁻¹ light photoperiod at 24 °C. In parallel, free-living mycelium of *L. bicolor* S238N was grown for 10 days on cellophane-covered agar (12 g L⁻¹) plates containing sugar-reduced Pachlewski medium P20. For mycorrhiza formation, plants were transferred to 12- × 12-cm petri dishes containing solidified (12 g L⁻¹ agar) low-carbon Pachlewski medium (P20), pH 5.8, buffered with 1 g L⁻¹ MES sodium salt covered by a 6- × 12-cm cellophane membrane. A mycelium-covered cellophane membrane was placed fungus side down on the roots. Petri dishes were closed with Band-Aids (ensuring high gas permeability). Cultures were arranged vertically, and the lower part of the dish was covered with a small black plastic bag to prevent light from reaching the fungus and roots. The co-cultures were incubated one month at 24 °C, under a 16 h d⁻¹ light photoperiod then the development of mature ectomycorrhizae was controlled under a stereoscope (CarlZeiss). At this stage, bacterial suspensions were prepared as described above. Seedlings of poplar colonized by *L. bicolor* were transferred in a large Petri dish filled with sterile PPB (Fig. S1). The cellophane membranes were detached by gentle agitation (1 min) and removed. Mycorrhized seedling were then transferred into a double Petri dish

setup containing the bacterial suspension (Fig. S1). The double Petri dish was designed to prevent contact between plant shoot and bacterial suspension. The systems were then incubated at 20 °C with gentle agitation (60 rpm) for 16h. Control treatments with poplar trees that were not inoculated with *L. bicolor* were also performed. After 16 h of incubation, mycorrhized and non-mycorrhized seedlings were transferred in a new double Petri dish to be washed with NaCl and PPB as described above. DAPI and WGA Alexa Fluor 633nm were used to stain roots and fungal hyphae, respectively. After staining, mycorrhized and non-mycorrhized root systems were dissected to recover non-fungal colonized roots, ectomycorrhizae, and fungal mycelium distant from the ectomycorrhizae. Each sample was then examined by confocal microscopy. For each treatment, two independent assays in duplicate were performed.

Enzymatic treatment of biofilms

To investigate the role of eDNA in biofilms formation, DNaseI (30 Kunitz units.mL⁻¹ Qiagen) was added to *P. fluorescens* BBc6 suspensions before the incubation with glass fibers. To analyze the composition of BBc6 biofilm filaments, biofilms grown for 16 h on glass fibres were treated with proteinase K (60 mAnson units.mL⁻¹ for 1 h, ThermoFisher), DNaseI (30 Kunitz units.mL⁻¹ Qiagen), RNase A (100 Kunitz units.mL⁻¹, ThermoFisher) or cellulase R10 (1 mg mL⁻¹, from *T. viride*, SERVA). All the enzymatic treatments were performed at room temperature for 1 h except DNase I that was applied 15 min only. Samples were then observed with LSCM. Positive controls were performed in the same conditions (incubation time and concentrations) to verify enzymatic activities for enzymes with no apparent effect on treated biofilms. Protease K activity was verified with non-fat dried skimmed milk powder as described by Nygren *et al.* (2007). Cellulase activity was verified with Azo- α -Cellulose according to the manufacturer's instructions (SIGMA). For RNase activity, total RNA from human placenta (1 μ g μ L⁻¹, Clontech) was treated and degradation was verified by electrophoretic migration of treated and non-treated RNA (negative control) in 1%-agarose gel stained with ethidium bromide.

6.2.3 Results

BBc6 biofilm formation on *L. bicolor* hyphae

Formation of biofilm-like structures by *P. fluorescens* BBc6 on *L. bicolor* S238N was previously reported (Deveau *et al.*, 2010). To test if these structures truly correspond to biofilms and to characterize them, an *in vitro* liquid setup that does not contain any nutrient source was used (Guennoc Miquel *et al.*, 2016). Time course imaging indicated a gradual over time bacterial colonization of the fungal hyphae (Fig. 1). After 30 minutes of interaction, few bacterial cells adhered on the surface of the hyphae (Fig. 1a, 1d). These bacteria were truly attached to the hyphae since planktonic and electrostatically-attached bacteria were removed by NaCl treatment before imaging (Toljander *et al.*, 2006). After 6 hours, the density of bacteria around the hyphae increased and cells started to form colonies (Fig. 1b, 1e). Bacterial cells were not all in direct contact with the hyphae but they rather seemed included in a matrix. Finally, after 20 hours, the bacteria formed a thick sheath constituted by several layers of bacterial cells wrapped around the hyphae (Fig. 1c, 1f). Observation of large sections of the fungal colonies showed that the biofilms were not evenly distributed but that they were mainly formed at the margin of the fungal colonies (Miquel-Guennoc *et al.*, 2016). Sparse adhesion also occurred deeper within the fungal colony but these cells never produced mature biofilms (Fig. 1c). To verify that the physical interaction between BBc6 and *L. bicolor* was not forced by the absence of nutrients, the biofilm formation was also tested in P5-nutrient rich medium. Similar results were obtained (data not shown). Therefore, biofilm formation was independent of the nutritive conditions tested.

Bacterial biofilms are characterized by the production of a complex matrix in which cells are embedded (Flemming *et al.*, 2016). To test whether bacterial biofilms on hyphae are also engulfed in a matrix and to identify some of the compounds building this matrix, LSCM coupled with multiple specific staining of proteins, DNA and polysaccharides were used. The three stains produced positive signals and demonstrated the presence of a matrix in which the fungal and bacterial cells were embedded (Fig. 2). This matrix exhibited local agglomerates

6.2. BACTERIAL BIOFILM FORMATION ON SOIL FUNGI : A WIDESPREAD ABILITY UNDER CONTROLS

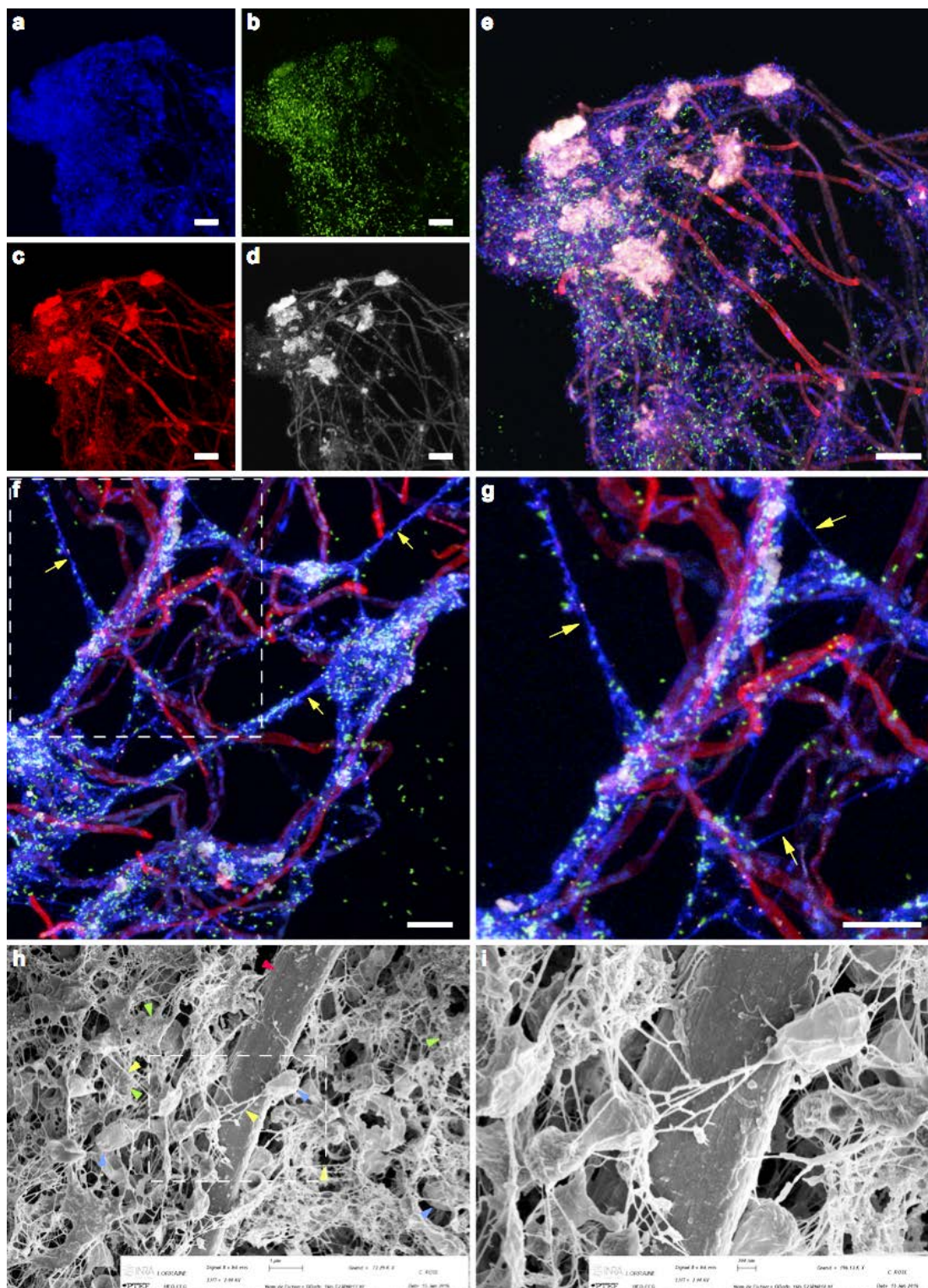


Figure 6.2 – BBc6 biofilm matrix of 16 h-old biofilms as observed by confocal (a-g) and electron microscopy (h-i). (see next page for full legend)

Figure 6.2 –

Multiple staining of matrix components of BBc6 biofilms on *L. bicolor* hyphae. Images (a-d) correspond to individual color channels from image (c). Fungal hyphae are stained with WGA Alexa Fluor 633 (red, c, e, f, g); bacteria are GFP-tagged (green, b, e, f, g); DNA is stained with DAPI (blue; a, e); proteins are stained with Sypro Ruby (d, e). Yellow arrows in (f-g) indicate filamentous structures in BBc6 biofilm matrices. (g) Corresponds to a zoom from white rectangle in (f). (h-i) SEM imaging of BBc6 biofilms on *L. bicolor* hyphae. Arrows in (h) indicate *L. bicolor* hyphae (red arrow), BBc6 cells (blue arrows), filamentous structures (yellow arrows) and granular material (green arrows) in BBc6 biofilm matrix. (i) Corresponds to a zoom from white rectangle in (h). Images (a-g) were obtained via 2D maximum intensity projection of 3D confocal microscopy images (stacks of 39 or 27 slices for e and f respectively). Imaging was performed at 40X magnification. (h-i) Imaging was performed at 2360X, EHT : 1kV. Before imaging the sample was slowly freeze-dried in the SEM chamber and coated with platinum. (a-g) Scale bars = 20 μ m. (h) Scale bars = 1 μ m. (i) Scale bars = 200 nm

stained by both Wheat germ agglutinin (WGA) lectin (Fig. 2c, 2e) and Sypro (Fig. 2d, 2e). Since WGA lectin and Sypro bind to sugars and to proteins, respectively, their co-localization could indicate agglomerates of glycoproteins. Diffused extracellular DNA was also observed in the matrix (Fig. 2a, e). Finally, thin linear structures stained by DAPI and to which bacterial cells seemed to be attached were noticed in the matrix (Fig. 2f, g). SEM imaging confirmed the presence of a matrix embedding the microbial cells (Fig. 2h, i). Anamorphous material was observed between cells on the surface of hyphae and surrounding the bacterial cells. Filaments anchored to the hyphae and linking the bacterial cells to each other were observed and could correspond to the linear structures observed by LSCM. Their diameters varied from few nanometers to 100 nm for the thicker ones.

Roots and ectomycorrhizal symbiosis interferes with bacterial biofilm formation on ectomycorrhizal hyphae

In a natural soil system, ectomycorrhizal fungi are almost constantly associated with tree roots, and this association likely influences bacterial/fungal interaction (Frey-Klett *et al.*, 2007). Moreover, many soil bacteria form biofilms on plants roots (Danhorn and Fuqua 2007). Thereby, we tested whether tree roots and the ectomycorrhizal symbiosis influence the formation of biofilms by *P. fluorescens* BBc6 on the hyphae of *L. bicolor*. Poplar cuttings were grown *in vitro* and used to

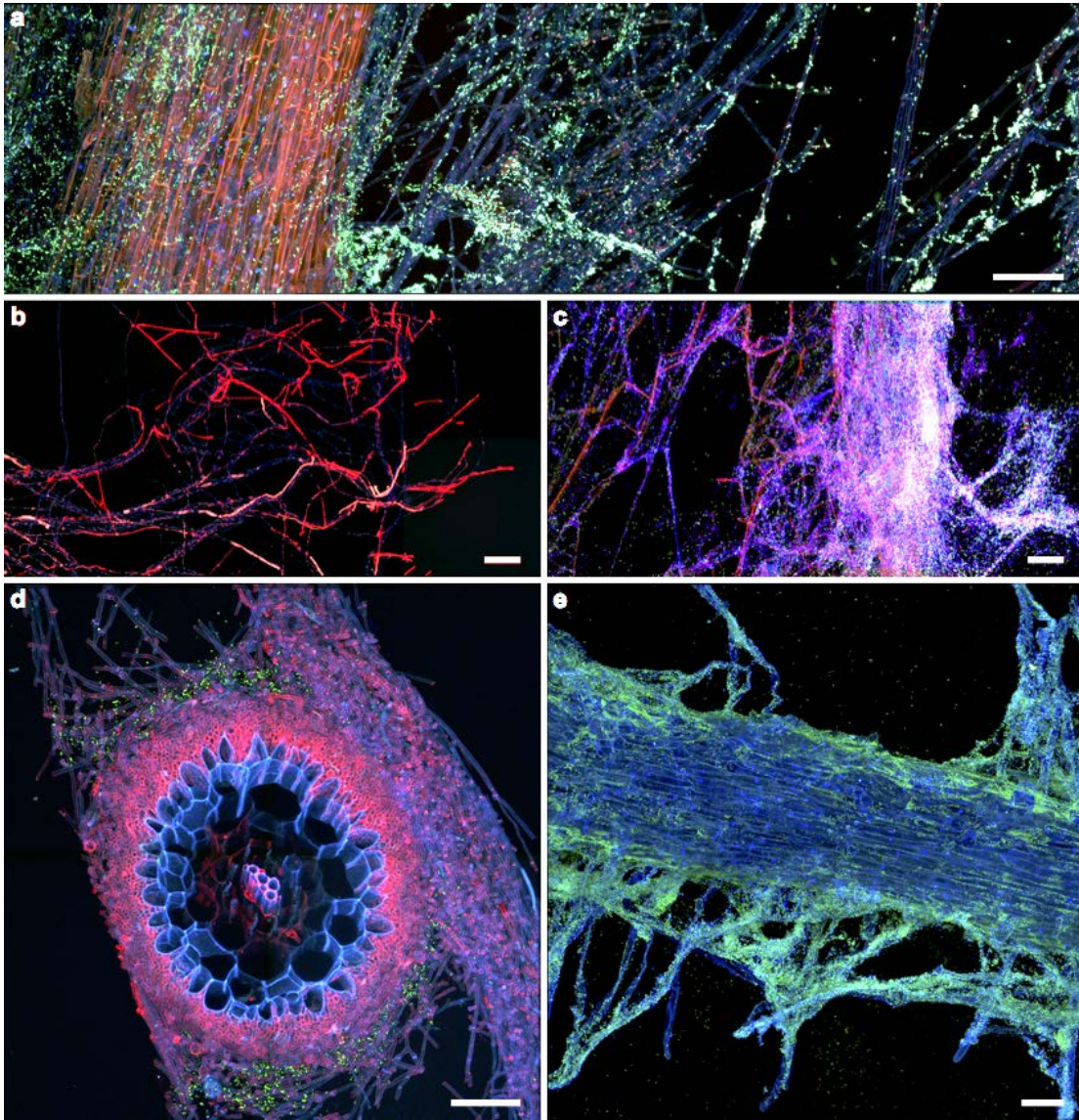


Figure 6.3 – BBc6 biofilms in *in vitro* *L. bicolor*-*Populus* roots symbiotic system

Imaging was performed after 16 hrs of interaction with BBc6. (a) *Populus* root and surrounding *L. bicolor* hyphae in a mycorrhizal system; (b) extramatrical mycelium of a *L. bicolor* colony in a mycorrhizal system; (c) extramatrical mycelium of a *L. bicolor* colony which was separated from a mycorrhizal system before interaction with BBc6; (d) transverse section of a *L. bicolor*-*Populus* mycorrhiza; (e) *Populus* roots alone with BBc6. On all images BBc6 is GFP-tagged (green). Except for (d) DNA is stained with DAPI (blue). (d-e) the blue signal is due to plant cell auto-fluorescence. (a-d) *L. bicolor* hyphae are stained with WGA 633, the result of the staining is heterogeneous possibly reflecting different physiological states between hyphae in mycorrhizal systems. These images were obtained via 2D maximum intensity projection of 3D confocal microscopy images (stacks of 35, 24, 30, 58 or 16 slices for a, b, c, d and e respectively). Imaging was performed at 40X magnification. Scale bars = 50 μm

produce ectomycorrhizae with *L. bicolor* S238N. Non-mycorrhized, mycorrhized roots and extramatrical hyphae were then incubated with *P. fluorescens* BBc6 bacteria in a liquid setup without nutrients for 16 hrs to assess biofilm formation (Fig. S1).

When ectomycorrhizae were present, BBc6 preferentially attached to the hyphae surrounding the roots (Fig. 3a) and to the ectomycorrhizal mantel (Fig. 3d) than to the extramatrical hyphae distant from the ectomycorrhizae (Fig. 3b). To verify that this result is due to the presence of ectomycorrhizae and not to a different physiological state of the fungus, a control was performed using a *L. bicolor* colony coming from a mycorrhizal system but for which the plant was removed before the contact with the bacteria (Fig. 3c). In this case, bacteria normally formed biofilms on the apical area of the fungal colony, suggesting that the presence of ectomycorrhizae is responsible for the change of distribution observed. Moreover, when poplar roots were used alone, the bacteria formed a thick biofilm at the surface of the roots (Fig. 3e).

Bacterial biofilm formation on hyphae is widespread among soil bacteria but is restricted to some fungi

We tested whether or not the formation of biofilm by *P. fluorescens* BBc6 on *L. bicolor* S238N was a specificity of the interaction between the mycorrhiza helper bacterium and the ectomycorrhizal fungus or whether it is a widespread interaction between soil bacterial and fungi. Thirteen soil cultivable bacteria spanning over taxa highly represented in soil and rhizosphere and with various ecological traits (e.g. MHB, biocontrol, pathogen, Table 1) were tested for their ability to form a biofilm on *L. bicolor* S238N hyphae. All bacteria formed biofilms around the hyphae (Fig. 4a) suggesting that the ability to form biofilm on fungal hyphae is widespread among soil bacteria. All the biofilms were localized on the apical area of the fungal colonies.

Conversely, we tested whether other ECM and non-ECM soil fungi than *L. bicolor* S238N could harbor bacterial biofilm using the strain BBc6 as a model bacterial strain (Table 1, Fig. 4b - 4e). The formation of bacterial biofilm on glass

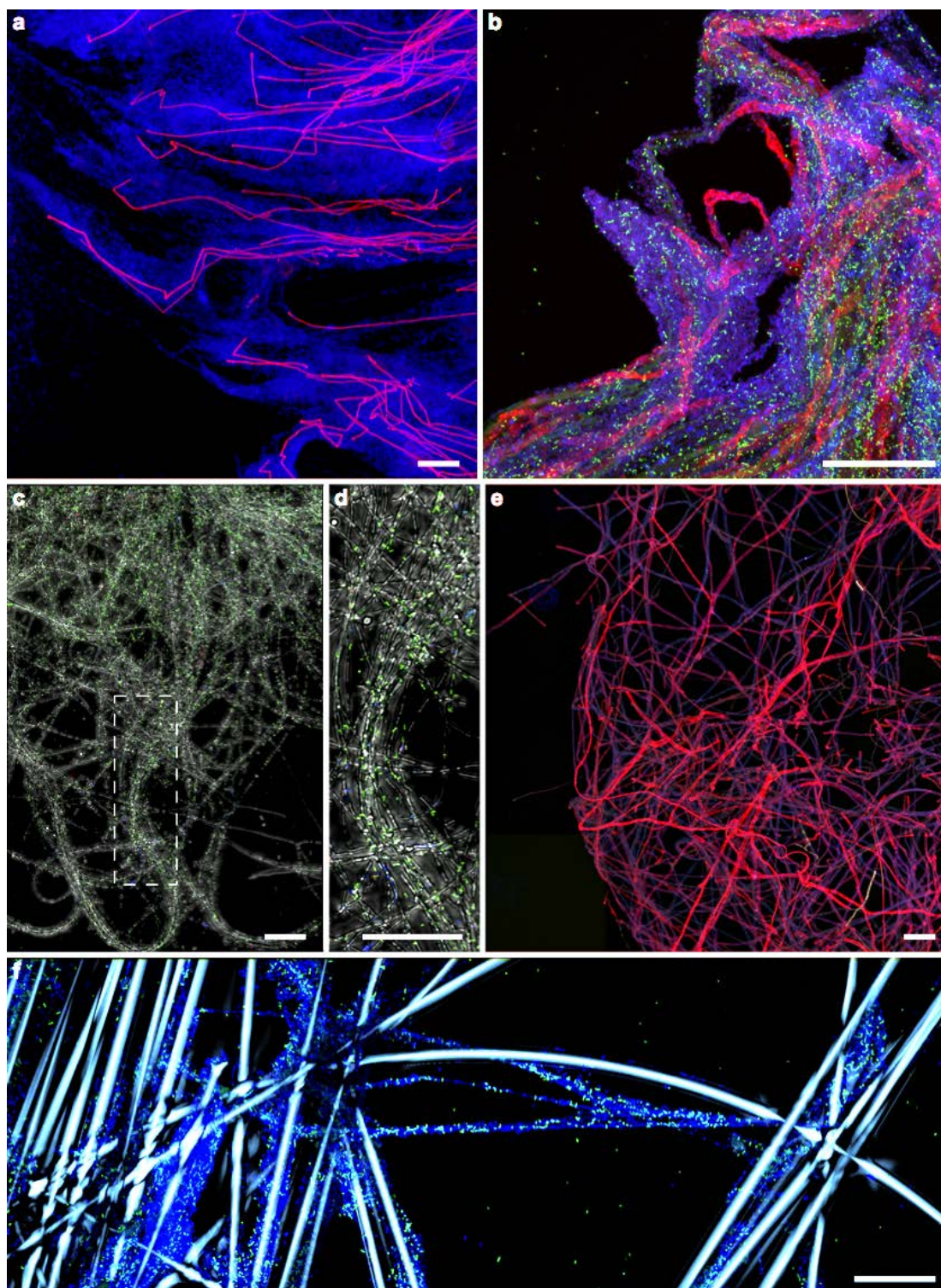


Figure 6.4 – Specificity of BBc6/*L. bicolor* *in vitro* interaction. (full legend in next page)

Figure 6.4 –

(a) *Paenibacillus* sp. F2001-L biofilms on *L. bicolor* hyphae; (b) BBc6 biofilms on *L. quietus* hyphae; (c) 16 hrs BBc6 attachment on *A. ustus* AU01 hyphae; (d) Zoom from white rectangle in (c); (e) absence of BBc6 cells on *T. melanosporum* hyphae after 16 h of interaction; (f) 22 h BBc6 biofilms on glass fibres. On all images DNA is stained with DAPI (blue) and BBc6 is GFP-tagged (green). (a-e) fungal hyphae are stained with WGA 633 (red). (d) *A. ustus* AU01 hyphae. These images were obtained via 2D maximum intensity projection of 3D confocal microscopy images (stacks of 21, 35, 44 or 45 slices for a, b, c, and e respectively). Imaging was performed at 40X magnification. Scale bars = 50 μ m

fibers was also assessed (Fig. 4f). Similar formation of biofilms was observed on all fungal strains (Fig. 4b) except three strains (Fig 4c, 4d and 4e). Only attachment of bacterial cells on the surface of the hyphae of the Ascomycetes *Aspergillus ustus* AU01 and *Penicillium funiculosum* PF01 was observed (Fig. 4c, 4d). Several individual bacterial cells were seen in direct contact with the hyphae but no matrix was detected. In contrast, no bacteria at all were observed on the surface of the hyphae of *Tuber melanosporum* Mel28 (Fig. 4e). These observations suggest that not all soil fungi allow biofilm formation on their hyphae while numerous soil bacteria can form a biofilm on hyphae.

Biofilm matrix skeleton is made of DNA filaments produced by bacteria

The structural organization of the filaments observed within the matrix suggested a potential key role of these filaments in the building and the maintenance of the biofilms. Their examination revealed that they formed dense and complex networks inside the biofilm matrix connecting fungal hyphae to which bacterial cells seemed to be attached (Fig. 2h - 2I; Fig. 5a - 2c). Similar filaments were observed in BBc6 biofilms formed on glass fibers indicating that these filaments are of bacterial origin (Fig. 5b - 5c). Filaments could be particularly long since some of them reached a length of several hundred of micrometers (Fig. 5c). The staining of the filaments by DAPI (Fig. 2f, 2g; Fig. 5b), a DNA specific dye, suggested a potential nucleic acid composition of these filaments. To further test this hypothesis, two other DNA specific stains were used. Both propidium iodide (Fig. 5a) and Topro3 (Fig. 5f) stained the filaments. In a second step, EDS-SEM

6.2. BACTERIAL BIOFILM FORMATION ON SOIL FUNGI : A WIDESPREAD ABILITY UNDER CONTROLS

Microbial strains	Taxonomic classification	Gram type	Ecological trait	Reference
Bacterial strains				
<i>Pseudomonas fluorescens</i> BBc6	Gamma-proteobacteria, Pseudomonadaceae	-	MHB	Duponnois & Garbaye 1991
<i>Pseudomonas protegens</i> Pf5	Gamma-proteobacteria, Pseudomonadaceae	-	Biocontrol	Howell & Stipanovic 1979
<i>Pseudomonas fluorescens</i> SBW25	Gamma-proteobacteria, Pseudomonadaceae	-	Plant Growth Promoting	Bailey <i>et al</i> 1995
<i>Pseudomonas fluorescens</i> Pf29A	Gamma-proteobacteria, Pseudomonadaceae	-	Bio-control	Chapon <i>et al</i> 2002
<i>Pseudomonas sp.</i> GM18	Gamma-proteobacteria, Pseudomonadaceae	-	MHB	Labbé <i>et al</i> 2014
<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>tomato</i> DC3000	Gamma-proteobacteria, Pseudomonadaceae	-	Plant pathogen	Cuppels 1986
<i>Dyella sp.</i> E3BF9_7	Gamma-proteobacteria, Rhodobacteriaceae	-	White rot associated	Hervé <i>et al</i> 2016
<i>Collimonas fungivorans</i> Ter331	Beta-proteobacteria, Oxalobacteriaceae	-	Mycophagous	de Boer <i>et al</i> 2004
<i>Burkholderia ginsengisoli</i> E3BF7_7	Beta-proteobacteria, Burkholderiaceae	-	White rot associated	Hervé <i>et al</i> 2016
<i>Sinorhizobium meliloti</i> 1021	Alpha-proteobacteria, Rhizobiaceae	-	Nitrogen fixing plant symbiont	Maede <i>et al</i> 1982
<i>Pedobacter sp.</i> D3AIN17A	Bacteroidetes, Sphingobacteriaceae	-	Black truffle associated	Deveau <i>et al</i> unpublished
<i>Paenibacillus sp.</i> F2001-L	Firmicutes, Paenibacillaceae	+	Endohyphal strain of <i>L. bicolor</i>	Bertaux <i>et al</i> 2003
<i>Bacillus subtilis</i> MB3	Firmicutes, Bacillaceae	+	MHB	Duponnois & Garbaye 1991
<i>Bacillus sp.</i> EJP109	Firmicutes, Bacillaceae	+	MHB	Poole <i>et al</i> 2001
Fungal strains				
<i>Laccaria bicolor</i> S238N	Basidiomycota, Tricholomataceae	na	ECM	Martin <i>et al</i> 2008
<i>Lactarius quietus</i>	Basidiomycota, Russulaceae	na	ECM	
<i>Hebeloma cylindrosporum</i>	Basidiomycota, Cortinariaceae	na	ECM	
<i>Piloderma croceum</i>	Basidiomycota, Atheliaceae	na	ECM	
<i>Phanerochaete chrysosporium</i> RP78	Basidiomycota, Phanerochaetaceae	na	saprotroph (white rot)	Hervé <i>et al</i> 2016
<i>Thelephora terrestris</i>	Basidiomycota, Thelephoraceae	na	ECM	
<i>Tuber melanosporum</i> Mel28	Ascomycota, Tuberaceae	na	ECM	Martin <i>et al</i> 2010
<i>Penicillium funiculosum</i> PF01	Ascomycota, Aspergillaceae	na	Plant pathogen	
<i>Aspergillus ustus</i> AU01	Ascomycota, Aspergillaceae	na	Plant Growth-Promoting	
<i>Elaphomyces granulatus</i> PEP	Ascomycota, Elaphomycetaceae	na	ECM	

Table 6.1 – Bacterial and fungal strains used in this study

Figure 6.5 – DNA-containing networks in bacterial biofilm matrices.

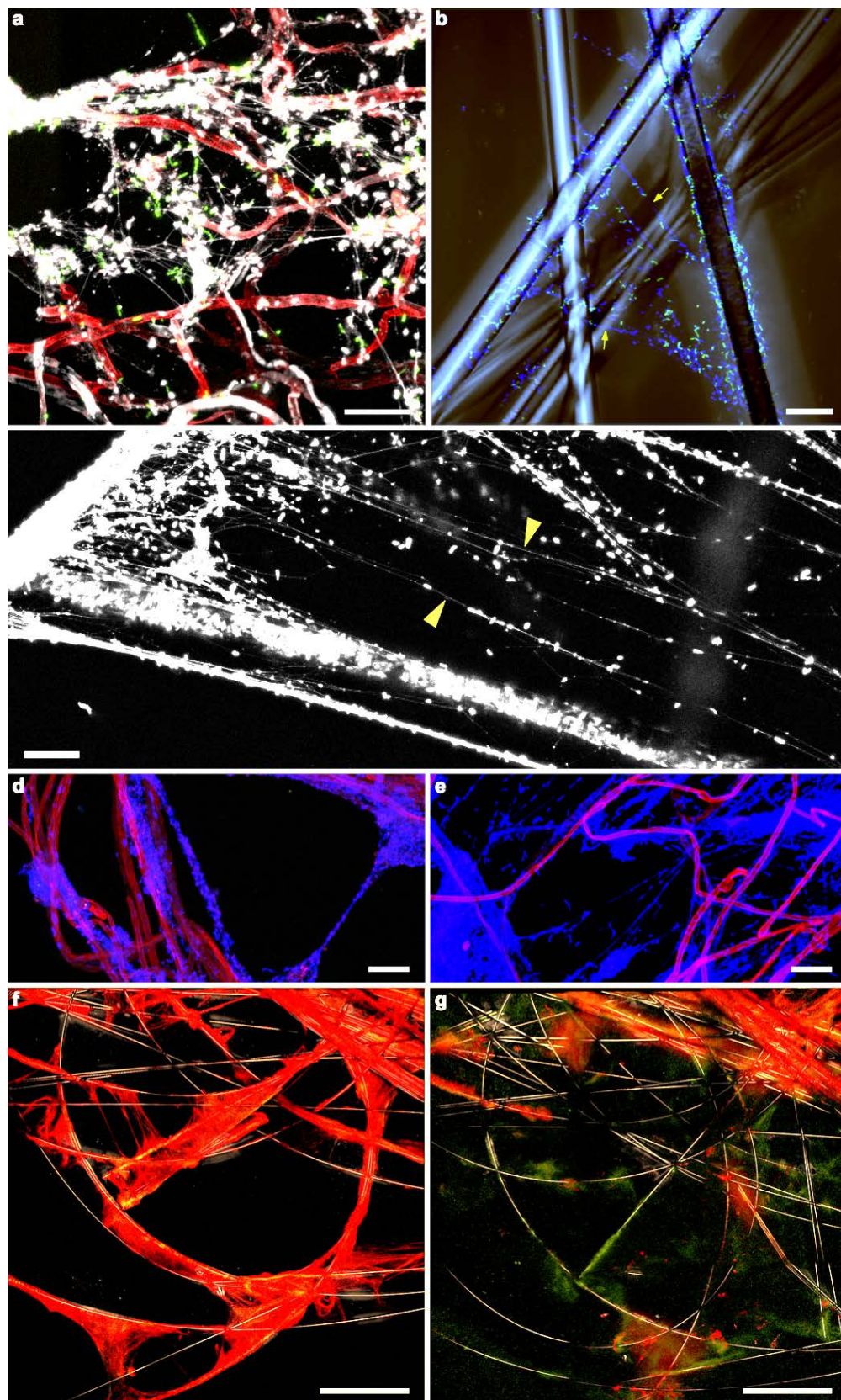


Figure 6.5 –

(d-e) Imaging was performed at 10X magnification. (a) BBc6 biofilms on *L. bicolor* hyphae, hyphae are stained by WGA 633 (red), BBc6 are GFP-tagged (green) and DNA is stained by propidium iodide (white). Contrast was forced to have a better visualization of the DNA-containing filaments. (b) BBc6 biofilms on glass fibers, BBc6 are GFP-tagged (green) and DNA is stained by DAPI (blue), DNA-containing filaments are indicated with yellow arrows. (c) BBc6 biofilms on glass fibers, BBc6 are GFP-tagged (green) and filaments stained with fun1 are indicated with yellow arrows. (d) *P. fluorescens* SBW25 biofilms on *L. bicolor* hyphae, DAPI-stained filaments are visible. (e) *Paenibacillus* sp. F2001-L biofilms on *L. bicolor* hyphae, DAPI-stained filaments are visible. (f) BBc6 biofilms on glass fibers before treatment with DNase I, BBc6 are GFP-tagged (green) and DNA is stained by Topro3 (red). (g) Same area than (f) but after DNase I treatment. (a-e) Scale bars = 20 μ m. These images were obtained via 2D maximum intensity projection of 3D confocal microscopy images. (a-c) Imaging was performed at 40X magnification. (f-g) Scale bars = 500 μ m

elemental mapping of biofilms grown on glass fibers was performed. In accordance to the hypothesis of a DNA constitution of the filaments, phosphorus and nitrogen, which are two major components of DNA, were both detected and mapped significantly at the surface of these filaments (Fig. S2). Lastly, we tested if DNase treatment would dismantle the biofilm structure and the filaments. The addition of DNase I almost instantaneously disrupted the biofilms and filaments were not visible anymore after the treatment (Fig. 5 f, 5g). In contrast, proteinase K, RNase and cellulases had no visible effect on the filaments and on the biofilm structure (data not shown). Altogether these data strongly support the hypothesis that the filaments are made of DNA and are an important structural component of BBc6 biofilms. To determine whether the use of DNA for a structural purpose is not due to a substitution strategy caused by the absence of carbon sources in the setup used, the presence of DNA filaments was verified by adding 2% of glucose to the incubation medium. No difference was observed (Data not shown). We also investigated whether eDNA was required for BBc6 biofilm formation by adding DNase I at the inoculation time of BBc6 cells with glass fibers. Almost no bacteria were attached to the glass fibers after 16 hrs indicating that eDNA is important for the initiation step of the biofilm formation. Finally, to determine if these DNA-containing filaments are specific of BBc6, their presence was checked in the biofilms formed by the 13 other bacterial strains previously described. Filaments, stained by DAPI, were retrieved in the biofilm matrix of all of the tested

strains (Fig. 5d, 5e) suggesting that it is a widespread biofilm feature among soil bacteria.

6.2.4 Discussion

Although bacterial biofilms are expected to be ubiquitous, little was known about their occurrence and characteristics among soil microorganisms. Here, we combined confocal and electronic microscopy to describe the structures, dynamic and specificities of *in vitro* biofilm formation by soil bacteria on fungal hyphae. Using the helper bacterial strain *P. fluorescens* BBc6 and the ectomycorrhizal fungus *L. bicolor* as model systems, we showed that the dynamic of bacterial biofilm formation and their structures were similar to those reported in the literature for other abiotic (e.g. plastics, silicon wafers) and biotic (e.g. roots, epithelial cells) surfaces. Similarly, to other bacterial biofilms, elevated levels of eDNA and proteins were found in the matrix of both biofilms formed on fungal hyphae and on glass fibers suggesting that these compounds are of bacterial origin, at least. It is likely that the matrix also contains other constituents such as polysaccharides, lipids, membrane vesicles or fimbriae, which are frequently reported in the literature but that have been investigated here (Flemming and Wingender, 2010). The formation of biofilm on fungal hyphae was not specific to *P. fluorescens* BBc6 as the 13 other bacterial strains tested were also able to form biofilms on *L. bicolor*. While these results reflect that the ability to form biofilms on fungal hyphae is widely shared among soil bacteria, some fungal species did not allow BBc6 biofilm formation on their hyphae. Moreover, the presence of plant roots and ectomycorrhizae could also influence bacterial biofilms formation, since in *Populus/L. bicolor* *in vitro* systems, BBc6 cells was mainly localized at the vicinity of the ectomycorrhizae. This study gives an overview of the large extent of potential physical interactions between bacteria and fungi in the soil. However, it should be kept in mind that all hereby experiments were performed in an *in vitro* setup to ease the visualization and analysis of the biofilms. Therefore, further studies are required to confirm the reality of these interactions in natural soils.

Webs formed by DNA containing-filaments could be a common structural feature in biofilm matrix of soil bacteria

The analysis of the biofilms formed on hyphae revealed that complex webs of eDNA-containing filaments to which bacteria seemed to be attached constituted a major structural component of biofilm matrices. If the presence of eDNA in bacterial biofilms is now well demonstrated (Whitchurch *et al.*, 2002, Flemming & Wingender 2010), its structuration into organized networks has been sparsely described. To the best of our knowledge, these structures have been reported for only 10 other bacterial strains belonging to Actinobacteria, Firmicutes, gamma-Proteobacteria and beta-Proteobacteria (Böckelmann *et al.*, 2006, Rose *et al.*, 2015; Barnes *et al.*, 2012; Tang *et al.*, 2013; Gloag *et al.*, 2013; Jurcisek and Bakaletz, 2007; Novotny *et al.*, 2013; Tran *et al.*, 2016a; Liao *et al.*, 2014). Our work indicates that they can also be produced by bacteria from the alpha-Proteobacteria and Bacteroidetes classes. eDNA-containing networks were detected for all the 14 bacterial strain tested (Table 1, Fig. 5d - 5e); this suggests that these eDNA skeletons are indeed a common feature of biofilm matrices of soil bacteria. Only a few reports of such structures have been made so far, probably because of the difficulties to observe these filaments with confocal microscopy and the necessity to apply appropriate dyes. Indeed, their diameters (a few tens of nanometers) reach the limit of the resolution of confocal microscopy. Yet, we expect that they would be found in several species from other environments with the appropriate tools and methods.

The ubiquity of these eDNA networks raises the question of their function in biofilm matrices. Several hypotheses have been proposed to explain the role of eDNA in bacterial biofilm matrices. The most reported one is to favor cell to cell connection within the matrix (Gloag *et al.*, 2013; Dengler *et al.*, 2015) and cell adhesion to surfaces (Das *et al.*, 2010; Regina *et al.*, 2014; Tang *et al.*, 2013). Additional studies proposed that eDNA could be involved in antimicrobial activities and antibiotic resistances of bacterial biofilms (Mulcahy *et al.*, 2008; Doroshenko *et al.*, 2014), or could direct the cell traffic flow within the biofilm matrix (Gloag *et al.*, 2013). Other authors hypothesized that DNA filaments could allow bacterial communication through electron transfer (Flemming *et al.*, 2007).

Interestingly similar DNA structures were reported to be produced by human neutrophils (Buhr and Köckritz-Blickwede, 2016), by plant roots (Driouich *et al.*, 2013; Wen *et al.*, 2009; Tran *et al.*, 2016a) and by an amoebae (Zhang *et al.*, 2016). In all cases, DNA webs were used to trap bacteria. Since the use of DNA to attach bacteria seems to be widespread in the living world, and it is therefore likely that, in a biofilm, eDNA networks mainly act as sticky webs maintaining cells together and anchoring them to the surface. This hypothesis is consistent with the disorganization of the biofilms and the inhibition of cell attachment after a treatment with DNase I observed in this study. Because biofilm formation is a dynamic process, mechanisms allowing cells detachment would be required to allow the colonization of new places. A recent study showed that the bacteria *Ralstonia solanacearum* produce DNase to free themselves from their own biofilms and from eDNA traps produced by roots (Tran *et al.*, 2016 a, b). Given the probable ubiquity of eDNA networks in biofilms, we expect such behavior to be common among biofilm forming bacteria.

While DNA is usually mainly considered to encode genetic information, non-coding DNA structures were produced by many bacterial species, but also by cells belonging to the Animal, Plant and Protist Kingdoms, namely four on the six Kingdoms of Life. This suggests that DNA, thanks to its sticky physico-chemical properties may actually have an additional universal function that has been overlooked so far.

To be or not to be a biofilm on hyphae : pros and cons

This work suggests that the ability to form biofilms on fungal hyphae is shared across diverse soil bacteria taxa with diverse ecological behaviors (Table 1); unsurprisingly because bacteria from a large number of families have been retrieved in the vicinity of fungi (i.e. the mycosphere) (Frey-Klett *et al.*, 2011, Warminck & van Elsas 2009). However, only three of the tested bacteria (*P. fluorescens* BBc6, *Paenibacillus* sp. F2001, *Bacillus subtilis* MB3) were originally isolated from the mycosphere of *L. bicolor*. This suggests a low degree of specificity for the fungal host : if possible, bacteria would rather tend to form a biofilm on hyphae than to stay in a planktonic stage. Nevertheless, the prevalence of the ability of bacteria

6.2. BACTERIAL BIOFILM FORMATION ON SOIL FUNGI : A WIDESPREAD ABILITY UNDER CONTROLS

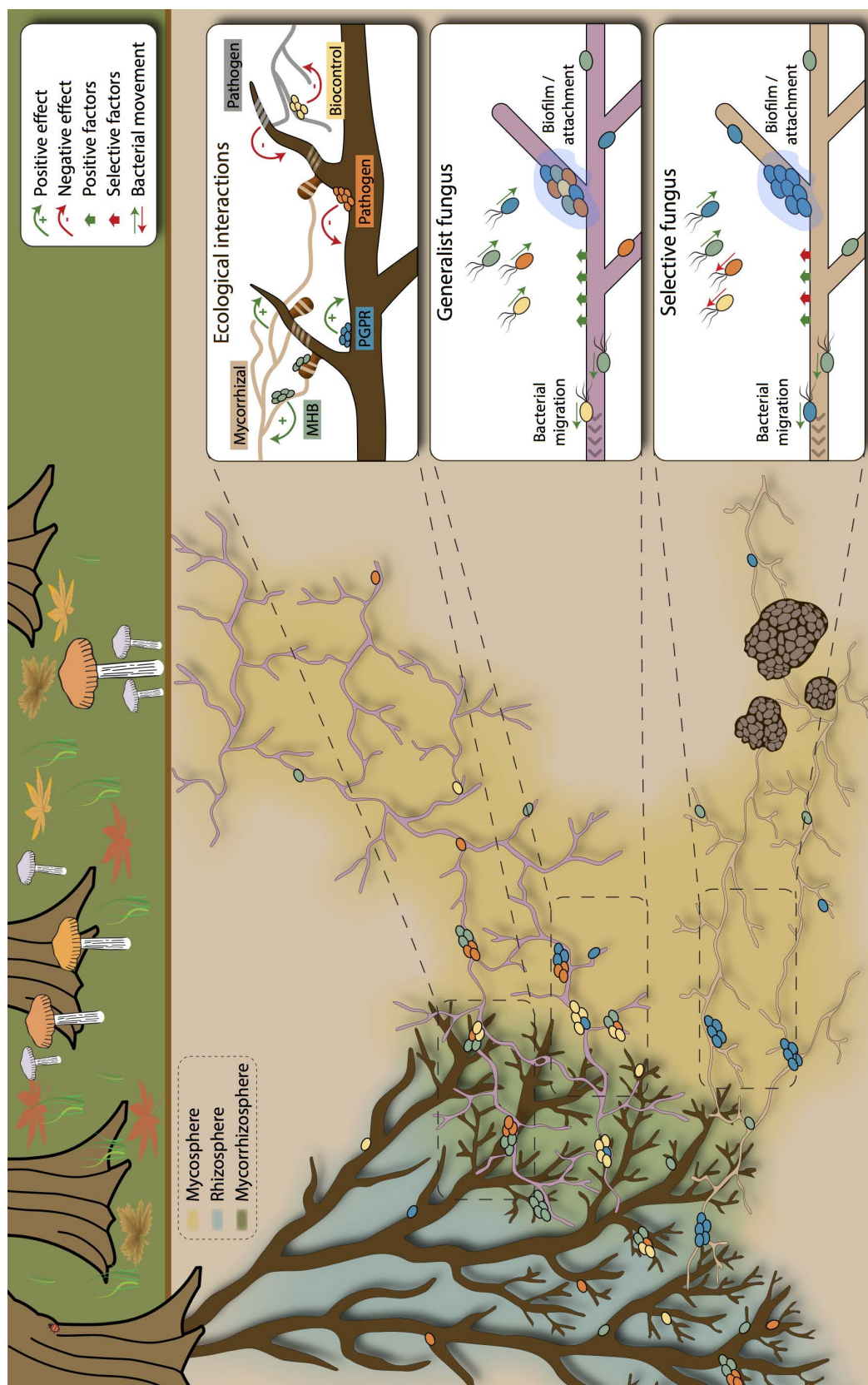


Figure 6.6 – Theoretical ecological model of bacterial/fungal physical interactions in forest soils.

to form biofilms on hyphae points to its potential involvement in many soil bacterial/fungal interactions, whether beneficial or detrimental (Fig. 6b), and could be explained by the many potential bacterial benefits offered by biofilm formation on fungal hyphae. The physical interaction may be initiated by the production of fungal signals that specifically attract bacteria (Deveau *et al.*, 2010, Stopnisek *et al.*, 2016). This might explain the preferential localization of the biofilms on the apical growing area of *L. bicolor* colonies. Indeed, in *L. bicolor*, like in many fungal species, this area corresponds to the metabolically active area contrasting to the central part, which is mostly assigned to storage (Fricker *et al.*, 2007). Therefore more metabolite secretions likely occur on the apical area, and induce trophic interactions. In accordance with this hypothesis, preliminary experiments showed a more even localization of the biofilm on dead hyphae of *L. bicolor* (data not shown). However, in several fungal species including *L. bicolor*, the hydrophobicity level of hyphae varies depending on the position within the colony (periphery vs. center) and on age of the hyphae (Smits *et al.*, 2003). It is thus possible that hydrophobicity also plays a role in the heterogeneous bacterial distribution on fungal colonies. Yet, biofilm distribution on glass fibers was also heterogeneous (Fig. 4f; Fig. 5b, 5c, 5f). Therefore, if hydrophobicity and nutrient release are involved in the biofilm distribution, they may not be the only determinant factors.

If the ability to form biofilms on fungal hyphae seemed to be largely shared among soil bacteria, the fungal partner may also play a key role to make bacterial settlement possible. While BBc6 formed biofilms on all the tested Basidiomycota, it failed to do so on three of the four tested Ascomycota (Table 1, Fig. 4b - 4e). Either the bacterial strain is not fit to interact with all fungi, either these Ascomycota produce negative factors that prevent bacterial biofilm establishment. Further studies will be necessary to untangle the two factors but given the ability of BBc6 to form biofilm on a large type of surfaces (data not shown) and the universal fungiphile character of *Pseudomonas* strains (Warminck and van Elsas 2009); the second hypothesis seems to be more likely. We expect that some fungi like *L. bicolor* would act as a “generalist” fungi permitting the settlement of a large number of bacterial species while other fungi would prevent the adhesion and/or biofilm formation by some bacteria. Interestingly, bacterial adhesion was observed on the hyphae *A. ustus* and *P. funiculosus* while it was fully prevented on the

hyphae of *T. melanosporum* suggesting that different mechanisms are involved in the inhibition of biofilm formation. Several hypotheses can be envisioned : differences in cell wall composition (Hogan & Kolter 2001), production of DNase by the fungi (Ferreira, 1998) that blocks eDNA mediated cell adhesion and quorum sensing interference (Uroz & Heinonsalo 2008).

Fungi are not the only players that could perturb biofilm formation in soils : our data suggest that bacteria preferentially establish on the surface of roots and of ectomycorrhizae rather than on extramatrical hyphae when the choice is given. This is likely due to a strong bacterial chemotaxis towards root and ectomycorrhizal exudates, well known to attract a large diversity of bacteria (Johanson et al 2004). Other substrates such as decaying litter and wood are also an important sources of nutrients on which bacteria form biofilms in soils (Burnmolle *et al.*, 2012). Those substrates may also be more attractive for bacteria than hyphae. However, bacteria cannot reach these nutrient oases unless the soil is water saturated or they find fungal highways along which they can migrate (Warminck et al 2011, Pion *et al.*, 2013). Thus, we might expect in soil, more frequent bacterial biofilms in nutrient hotspots such as the mycorrhizosphere than in the mycosphere. However, “permissive” mycospheres under no chemical influence of roots are likely to harbor biofilms from multiple bacterial species, from which bacterial cells would disperse thanks to fungal highways, as illustrated in Fig. 6.

6.2.5 Conclusion & perspectives

This work highlights the complexity and the large extent of possible bacterial/fungal physical interactions in soil. It opens the way to both molecular and ecology studies to, i) identify the molecular determinants that allow or not biofilm formation on hyphae and the molecular exchanges taking place in these biofilms and ii) to explore how complex bacterial communities behave in the mycosphere of soils. Finally, our work revealed an unexpected widespread feature of bacterial biofilms : eDNA-containing filamentous structures. Further experiments are required to pinpoint their full chemical composition and to fully understand their role in biofilm formation and functioning. Beyond their role in bacterial biofilms struc-

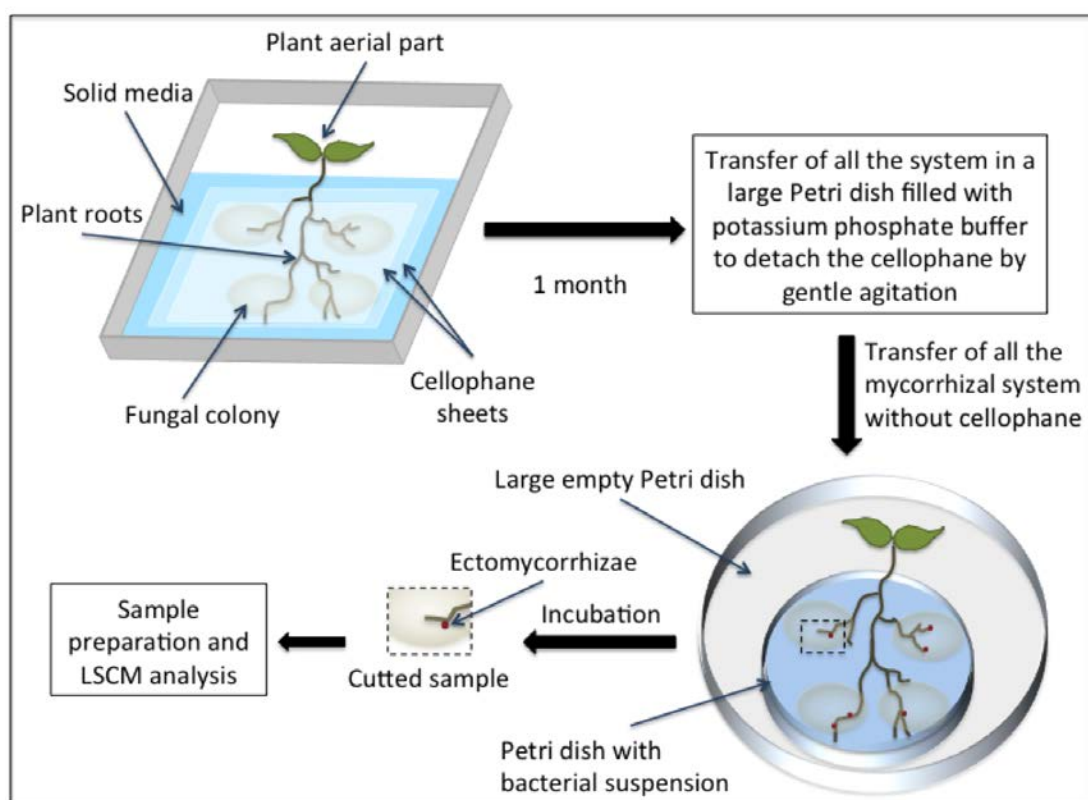


Figure 6.7 – (fig. S1) Protocole for BBc6 biofilm formation on *L. bicolor*/*Populus* mycorrhizal system.

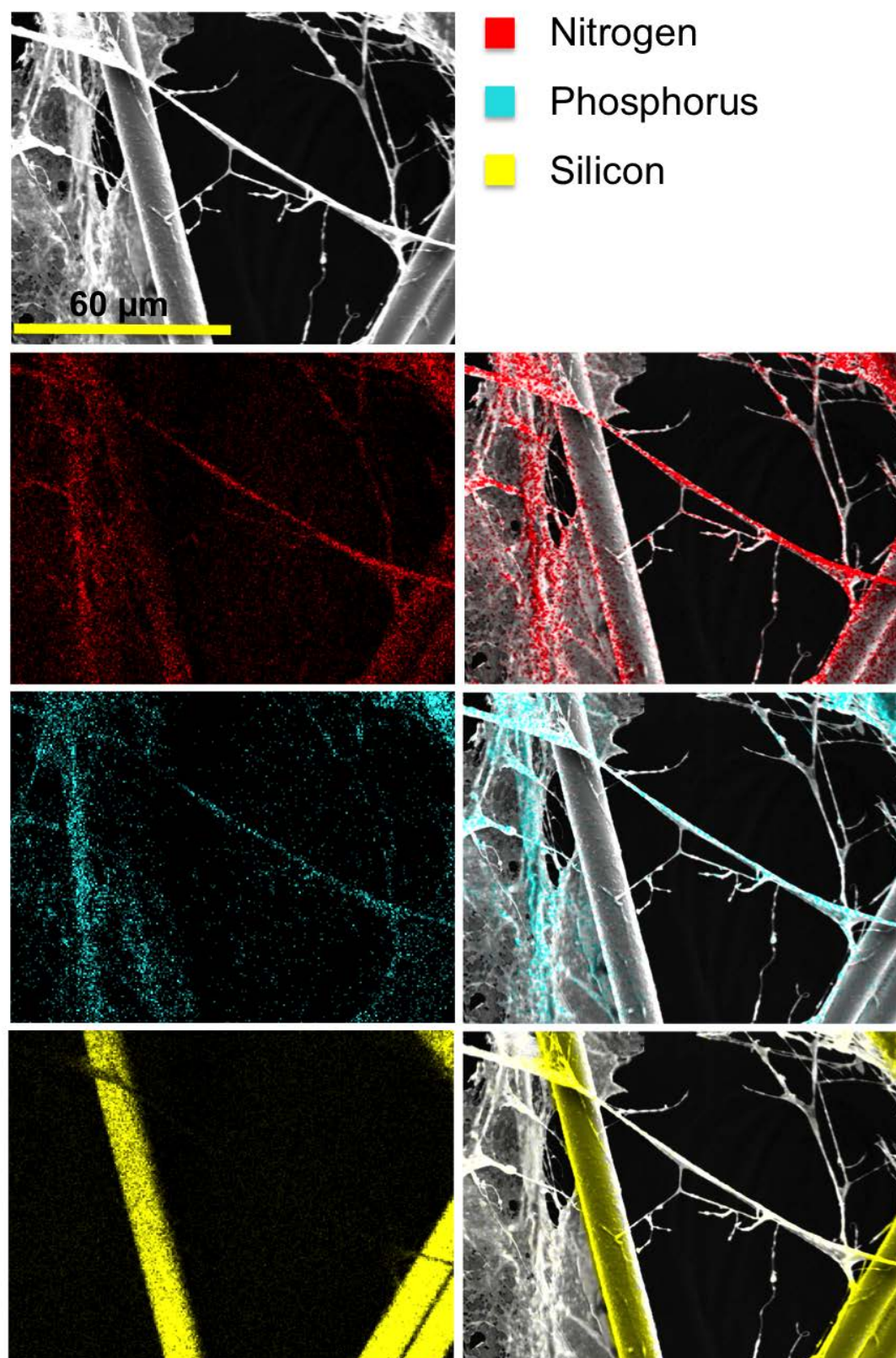


Figure 6.8 – (fig. S2) SEM elemental map of filaments observed in BBc6 biofilms.

tures, the DNA nature of these filaments shed light on an unexpectedly overlooked role for the DNA molecule.

Acknowledgements

This work was supported by the French National Research Agency through the Laboratory of Excellence ARBRE (ANR-11-LABX-0002-01) and by the Plant-Microbe Interfaces Scientific Focus Area in the Genomic Science Program, the Office of Biological and Environmental Research in the U.S. Department of Energy Office of Science. Oak Ridge National Laboratory is managed by UT-Battelle, LLC, for the U.S. Department of Energy under contract DE-AC05-00OR22725. We thank Frédéric Guinnet (INRA) for helping with the preparation of *in vitro* mycorrhized seedlings, Anais Gilet (INRA) for providing fungal strains and Béatrice Palin for technical support along the experiments.

References

- Anderson IC, Cairney JWG. (2007). Ectomycorrhizal fungi : exploring the mycelial frontier. *FEMS Microbiol Rev* **31** : 388–406.
- Barnes AMT, Ballering KS, Leibman RS. (2012). *Enterococcus faecalis* Produces Abundant Extracellular Structures. *mBio* **3** : 1–9.
- Di Battista C, Selosse M-A, Bouchard D, Senström E, Le Tacon F. (1996). Variations in symbiotic efficiency, phenotypic characters and ploidy level among different isolates of the ectomycorrhizal basidiomycete *Laccaria bicolor* strain S238. *Mycol Res* **100** : 1315–1324.
- Böckelmann U, Janke A, Kuhn R, Neu TR, Wecke J, Lawrence JR, *et al.* (2006). Bacterial extracellular DNA forming a defined network-like structure. *FEMS Microbiol Lett* **262** : 31–38.
- Bolwerk A, Lagopodi AL, Wijfjes AHM, Lamers GEM, Thomas FC, Lugtenberg BJJ, *et al.* (2003). Interactions in the Tomato Rhizosphere of Two *Pseudomonas* Biocontrol Strains with the Phytopathogenic Fungus *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici*. *MPMI* **16** : 983–993.
- Bonfante P, Anca I-A. (2009). Plants, mycorrhizal fungi, and bacteria : a network of interactions. *Annu Rev Microbiol* **63** : 363–83.
- Brinkmann V, Reichard U, Goosmann C, Fauler B, Uhlemann Y, S. Weiss D, *et al.* (2004). Neutrophil Extracellular Traps Kill Bacteria. *Science* **303** : 1532–1535;
- Brinkmann V, Zychlinsky A. (2012). Neutrophil extracellular traps : Is immunity the second function of chromatin ? *J Cell Biol* **198** : 773–783.

Buhr N De, Köckritz-blickwede M Von. (2016). How Neutrophil Extracellular Traps Become Visible. *Journal of Immunology Research* Volume **2016**.

Burmølle M, Kjølter AH, Sørensen SJ. (2012). An invisible workforce. In : Lear G, Lewis GD (eds). *Microbial biofilms : current research and applications*. Caister Academic Press, 61–71.

Das T, Sharma PK, Busscher HJ, Van Der Mei HC, Krom BP. (2010). Role of extracellular DNA in initial bacterial adhesion and surface aggregation. *Appl Environ Microbiol* **76** : 3405–3408.

Davies D. (2003). Understanding biofilm resistance to antibacterial agents. *Nat Rev Drug Discov* **2** : 114–22.

Dengler V, Foulston L, DeFrancesco AS, Losick R. (2015). An electrostatic net model for the role of extracellular DNA in biofilm formation by *Staphylococcus aureus*. *J Bacteriol* **197** : 3779–3787.

DePas WH, Syed AK, Sifuentes M, Lee JS, Warshaw D, Saggar V, *et al.* (2014). Biofilm formation protects *Escherichia coli* against killing by *Caenorhabditis elegans* and *Myxococcus xanthus*. *Appl Environ Microbiol* **80** : 7079–7087.

Deveau a, Gross H, Morin E, Karpinets T, Utturkar S, Mehnaz S, *et al.* (2014). Genome Sequence of the Mycorrhizal Helper Bacterium *Pseudomonas fluorescens* BBc6R8. *Genome Announc* **2** : e01152-13.

Doroshenko N, Tseng BS, Howlin RP, Deacon J, Wharton JA, Thurner PJ, *et al.* (2014). Extracellular DNA impedes the transport of vancomycin in *Staphylococcus epidermidis* biofilms preexposed to subinhibitory concentrations of vancomycin. *Antimicrob Agents Chemother* **58** : 7273–7282.

Driouich A, Follet-Gueye ML, Vicré-Gibouin M, Hawes M. (2013). Root border cells and secretions as critical elements in plant host defense. *Curr Opin Plant Biol* **16** : 489–495.

Ferreira AVB. (1998). Intra and extracellular nuclease production by *Aspergillus niger* and *Aspergillus nidulans*. *Rev Microbiol* **29** : 282–285.

Finlay RD. (2008). Ecological aspects of mycorrhizal symbiosis : with special emphasis on the functional diversity of interactions involving the extraradical mycelium. *J Exp Bot* **59** : 1115–26.

Flemming H-C, Wingender J, Szewzyk U, Steinberg P, Rice SA, Kjelleberg S. (2016). Biofilms : an emergent form of bacterial life. *Nat Rev Microbiol* **14** : 563–575.

Flemming H, Wingender J. (2010). The biofilm matrix. *Nat Publ Gr* **8** : 623–633.

Flemming HC, Neu TR, Wozniak DJ. (2007). The EPS matrix : The ‘House of Biofilm Cells’. *J Bacteriol* **189** : 7945–7947.

Frey-Klett P, Garbaye J, Tarkka M. (2007). The mycorrhiza helper bacteria revisited. *New Phytol* **176** : 22–36.

Fricker M, Boddy L, Bebbler D. (2007). Network organisation of mycelial fungi. In *The Mycota VIII : Biology of the Fungal Cell*, Springer-Verlag Berlin, 309–330.

Furuno S, Remer R, Chatzinotas A, Harms H, Wick LY. (2012). Use of mycelia as paths for the isolation of contaminant-degrading bacteria from soil. *Microb Biotechnol* **5** : 142–8.

Gloag ES, Turnbull L, Huang A, Vallotton P, Wang H, Nolan LM, *et al.* (2013). Self-organization of bacterial biofilms is facilitated by extracellular DNA. *Proc Natl Acad Sci U S A* **110** : 11541–6.

Gougoulas C, Clark JM, Shaw LJ. (2014). The role of soil microbes in the global carbon cycle : tracking the below-ground microbial processing of plant-derived carbon for manipulating carbon dynamics in agricultural systems. *J Sci Food Agric* **94** : 2362–2371.

Harmsen M, Lappann M, Knøchel S, Molin S. (2010). Role of extracellular DNA during biofilm formation by *Listeria monocytogenes*. *Appl Environ Microbiol* **76** : 2271–2279.

Van Der Heijden MGA, Bardgett RD, Van Straalen NM. (2008). The unseen majority : Soil microbes as drivers of plant diversity and productivity in terrestrial ecosystems. *Ecol Lett* **11** : 296–310.

Herath HMLI, Upamali A, Vithanage M, Seneviratne G. (2014). Developed fungal – bacterial biofilms as a novel tool for bioremoval of hexavalent chromium from wastewater. *Chem Ecol* **0** : 1–10.

Hogan D a, Wargo MJ, Beck N. (2007). Bacterial Biofilms on Fungal Surfaces 13. In : *The biofilm mode of life : mechanisms and adaptations*.2. pp 235–245.

Jefferson KK. (2004). What drives bacteria to produce a biofilm ? FEMS Microbiology Letters **236** : 163–173.

Jurcisek JA, Bakaletz LO. (2007). Biofilms formed by nontypeable *Haemophilus influenzae* in vivo contain both double-stranded DNA and type IV pilin protein. *J Bacteriol* **189** : 3868–3875.

Kjelleberg S, Givskov M. (2007). The biofilm mode of life : mechanisms and adaptations. *Horizon Bioscience*.

Koechler S, Farasin J, Cleiss-Arnold J, Arsène-Ploetze F. (2015). Toxic metal resistance in biofilms : Diversity of microbial responses and their evolution. *Res Microbiol* **166** : 764–773.

Kohlmeier S, Smits THM, Ford RM, Keel C, Harms H, Wick LY. (2005). Taking the fungal highway : Mobilization of pollutant-degrading bacteria by fungi. *Environ Sci Technol* **39** : 4640–4646.

Liao S, Klein MI, Heim KP, Fan Y, Bitoun JP, Ahn S-J, *et al.* (2014). *Streptococcus mutans* Extracellular DNA Is Upregulated during Growth in Biofilms, Actively Released via Membrane Vesicles, and Influenced by Components of the Protein Secretion Machinery. *J Bacteriol* **196** : 2355–2366.

Martin F, Aerts a, Ahrén D, Brun a, Danchin EGJ, Duchaussoy F, *et al.* (2008). The genome of *Laccaria bicolor* provides insights into mycorrhizal symbiosis. *Nature* **452** : 88–92.

Martin F, Tunlid AN. (2009). The Ectomycorrhizal Symbiosis : a Marriage of Convenience. In : *The Mycota*. Springer Berlin Heidelberg : Berlin, Heidelberg, pp 237–257.

Martins M, Uppuluri P, Thomas DP, Cleary IA, Henriques M. (2010). Presence of extracellular DNA in the *Candida albicans* biofilm matrix and its contribution to biofilms. *NIH Public Access* **48** : 1–6.

Matz C, McDougald D, Moreno AM, Yung PY, Yildiz FH, Kjelleberg S. (2005). Biofilm formation and phenotypic variation enhance predation-driven persistence of *Vibrio cholerae*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102** : 16819–24.

Miquel-Guennoc C, Rose, Guinet F, Miquel I, Labbé J, Deveau A. (2016). A new method for qualitative multi-scale analysis of bacterial biofilms on filamentous fungal colonies using confocal and electron microscopy. JovE at [http ://www.jove.com/video/54771/](http://www.jove.com/video/54771/)

Van de Mortel M, Chang W-S, Halverson LJ. (2004). Differential tolerance of *Pseudomonas putida* biofilm and planktonic cells to desiccation. *Biofilms* **1** : 361–368.

Mulcahy H, Charron-Mazenod L, Lewenza S. (2008). Extracellular DNA chelates cations and induces antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *PLoS Pathog* **4**.

Nadell CD, Drescher K, Wingreen NS, Bassler BL. (2015). Extracellular matrix structure governs invasion resistance in bacterial biofilms. *ISME J* **9** : 1700–1709.

Nazir R, Warmink JA, Boersma H, Van Elsas JD. (2010). Mechanisms that promote bacterial fitness in fungal-affected soil microhabitats. *FEMS Microbiol Ecol* **71** : 169–185.

Novotny LA, Amer AO, Brockson ME, Goodman SD, Bakaletz LO. (2013). Structural Stability of *Burkholderia cenocepacia* Biofilms Is Reliant on eDNA Structure and Presence of a Bacterial Nucleic Acid Binding Protein. *PLoS One* **8** : 1–15.

Nurmiaho-Lassila E, Timonen S, Haahtela K, Sen R. (1997). Bacterial colonization patterns of intact *Pinus sylvestris* mycorrhizospheres in dry pine forest soil : an electron microscopy study. *Can J Microbiol* **43** : 1017–1035.

Philippot L, Raaijmakers JM, Lemanceau P, van der Putten WH. (2013). Going back to the roots : the microbial ecology of the rhizosphere. *Nat Rev Microbiol* **11** : 789–99.

Pion M, Bshary R, Bindschedler S, Filippidou S, Wick LY, Job D, *et al.* (2013). Gains of bacterial flagellar motility in a fungal world. *Appl Environ Microbiol* **79** : 6862–6867.

Regina VR, Lokanathan AR, Modrzyński JJ, Sutherland DS, Meyer RL. (2014). Surface physicochemistry and ionic strength affects eDNA's role in bacterial adhesion to abiotic surfaces. *PLoS One* **9** : 1–7.

Rose SJ, Babrak LM, Bermudez LE. (2015). Mycobacterium avium possesses extracellular DNA that contributes to biofilm formation, structural integrity, and tolerance to antibiotics. *PLoS One* **10** : 1–17.

Schimel JP, Schaeffer SM. (2012). Microbial control over carbon cycling in soil. *Front Microbiol* **3** : 348.

Seneviratne G, Tennakoon NS, Nandasena KA, Weerasekarak MLMAW. (2006). Polyethylene biodegradation by a developed *Penicillium* – *Bacillus* biofilm. *Curr Sci* **90** : 99–101.

Simon A, Bindschedler S, Job D, Wick LY, Filippidou S, Kooli WM, *et al.* (2015). Exploiting the fungal highway : Development of a novel tool for the in situ isolation of bacteria migrating along fungal mycelium. *FEMS Microbiol Ecol* **91** : 1–13.

Sizemore RK, Caldwell JJ, Kendrick a S. (1990). Alternate gram staining technique using a fluorescent lectin. *Appl Environ, Microbiol* **56** : 2245–2247.

Tang L, Schramm A, Neu TR, Revsbech NP, Meyer RL. (2013). Extracellular DNA in adhesion and biofilm formation of four environmental isolates : A quantitative study. *FEMS Microbiol Ecol* **86** : 394–403.

Toljander JF, Artursson V, Paul LR, Jansson JK, Finlay RD. (2006). Attachment of different soil bacteria to arbuscular mycorrhizal fungal extraradical hyphae is determined by hyphal vitality and fungal species. *FEMS Microbiol Ecol* **254** : 34–40.

Tran T, MacIntyre A, Allen C, C HM. (2016a). Escaping Underground Nets : Extracellular DNases Degrade Plant Extracellular Traps and Contribute to Virulence of the Plant Pathogenic Bacterium *Ralstonia solanacearum*. *PLoS Pathog* **12** : 1–26.

Tran T, MacIntyre A, Khokhani D, Hawes MC, Allen C. (2016b). Extracellular DNases of *Ralstonia solanacearum* modulate biofilms and facilitate bacterial wilt virulence. *Environ Microbiol Environ Microbiol Reports*, doi : 10.1111/1462-2920.13446.

Türetgen I, Ilhan-Sungur E, Cotuk A. (2007). Effects of short-time drying on biofilm-associated bacteria. *Ann Microbiol* **57** : 277–280.

Warmink J a., Nazir R, Corten B, van Elsas JD. (2011). Hitchhikers on the fungal highway : The helper effect for bacterial migration via fungal hyphae. *Soil Biol Biochem* **43** : 760–765.

Warmink J a, van Elsas JD. (2009). Migratory response of soil bacteria to *Lyophyllum* sp. strain Karsten in soil microcosms. *Appl Environ Microbiol* **75** : 2820–30.

Wen F, White GJ, VanEtten HD, Xiong Z, Hawes MC. (2009). Extracellular DNA is required for root tip resistance to fungal infection. *Plant Physiol* **151** : 820–829.

Whitchurch CB, Tolker-nielsen T, Ragas PC, Mattick JS, Mattickl JS. (2002). Extracellular DNA Required for Bacterial Biofilm Formation. *Science* **295** : 1487.

Wick LY, Remer R, Würz B, Reichenbach J, Braun S, Schäfer F, *et al.* (2007). Effect of fungal hyphae on the access of bacteria to phenanthrene in soil. *Environ Sci Technol* **41** : 500–505.

Zhang X, Zhuchenko O, Kuspa A, Soldati T. (2016). Social amoebae trap and kill bacteria by casting DNA nets. *Nat Commun* **7** : 10938.

6.3 Résultats complémentaires préliminaires

6.3.1 Pour aller plus loin avec les Ascomycètes

Les résultats présentés dans la section précédente semblent indiquer que les Ascomycètes constituent une surface moins favorable à la formation de biofilms par BBc6 que les Basidiomycètes. Afin de vérifier cette hypothèse la formation de biofilms de BBc6 a pour l'instant été testée sur deux autres Ascomycetes¹ : *Meliniomyces variabilis* et *Tuber magnatum*. Bien que ces tests nécessitent des répétitions, les résultats préliminaires obtenus sont intéressants.

Concernant *T. magnatum* les résultats obtenus (fig. 6.9) étaient similaires à ceux de *T. melanosporum* (fig. 6.4), puisqu'aucune bactérie n'était présente sur les hyphes, ce qui suggère que la capacité à inhiber l'adhésion bactérienne pourrait être répandue chez le genre *Tuber*. De façon intéressante une étude a montré que l'adhésion de bactéries du genre *Rhizobium* sur les hyphes de *T. borchii* était soumise à des mécanismes sélectifs stricts, faisant intervenir la reconnaissance et la liaison spécifique à une lectine présente sur les parois du champignon (Cerigini *et al.* 2008). Un tel mécanisme, empêchant l'adhésion en l'absence de reconnaissance de cibles spécifiques, pourrait expliquer les résultats obtenus pour BBc6 sur les deux champignons du genre *Tuber*. Toutefois, un essai préliminaire a montré une formation de biofilm par BBc6 sur les hyphes de *T. melanosporum* lorsque ceux-ci étaient préalablement tués par congélation (fig. 6.10), ce qui pourrait indiquer que l'inhibition de l'adhésion nécessite également un mécanisme actif de la part du champignon.

Concernant *M. variabilis*, un biofilm de taille importante formé par BBc6 a été observé en région apicale de la colonie fongique (fig. 6.11). La capacité à inhiber la formation de biofilms par BBc6 pourrait donc ne pas être répandue chez les Ascomycètes mais plutôt restreinte à quelques familles au sein de ces derniers. En effet, seul des champignons appartenant à la famille des *Aspergillaceae* (*A. ustus*

1. L'analyse a été réalisée en triplicats biologiques selon le même protocole que celui présenté dans le chapitre 4

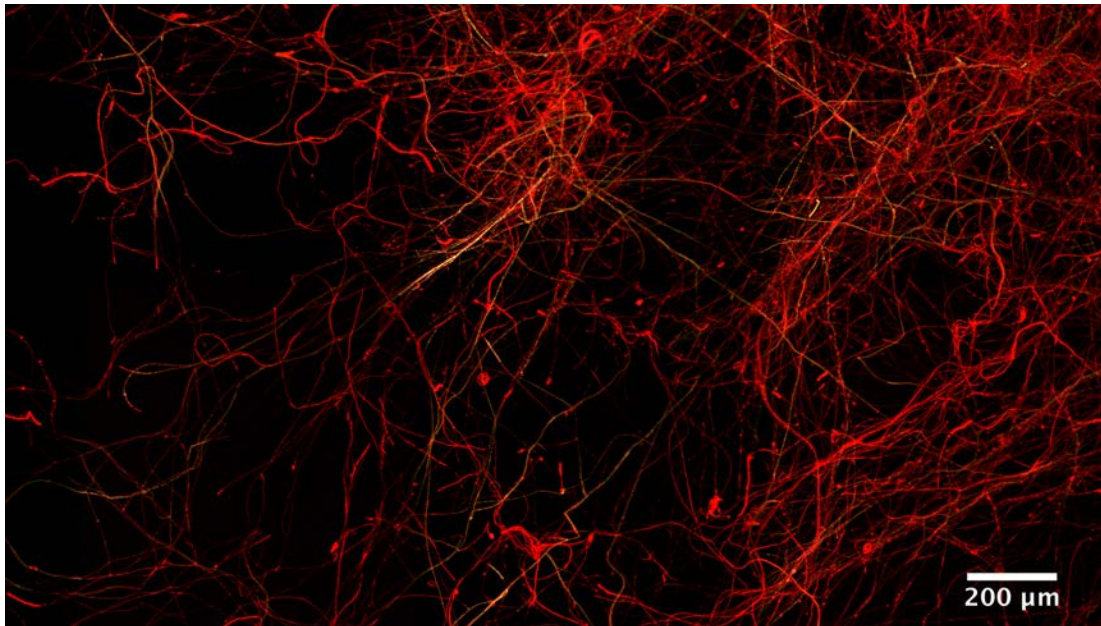


Figure 6.9 – Test de la formation de biofilms de BBc6 sur *T. magnatum*.

Cette image prise après 16 h d'interaction entre BBc6 et *T. magnatum* a été obtenue par projection 2D de coupes optiques obtenues par microscopie confocale au grossissement 10X. La souche de BBc6 utilisée produit de la GFP (en vert) et les hyphes fongiques sont marqués au WGA 633 (en rouge).

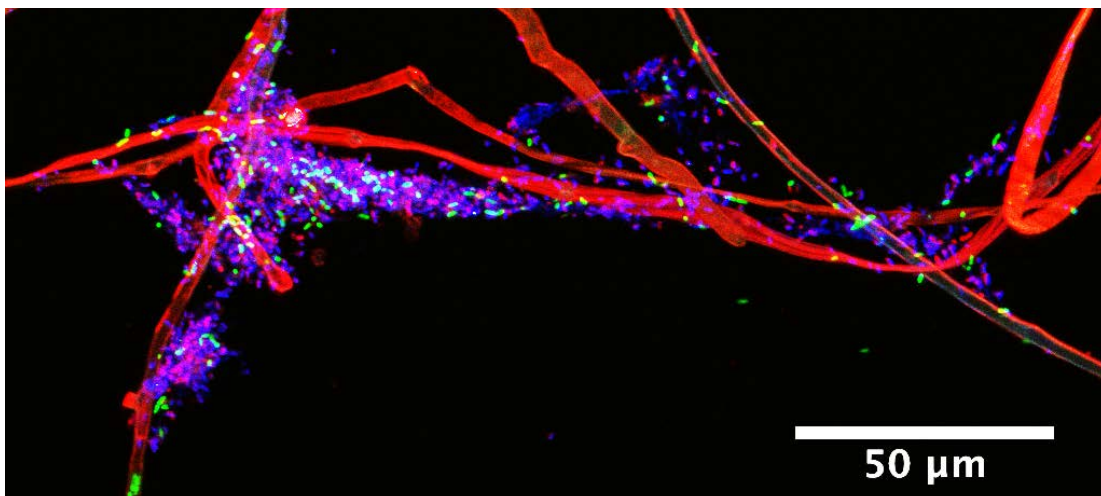


Figure 6.10 – Formation de biofilms par BBc6 sur *T. melanosporum* préalablement tué par congélation.

Cette image a été prise après 16 h d'interaction entre BBc6 et *T. melanosporum* préalablement tué par congélation à -80°C . Elle a été obtenue par projection 2D de coupes optiques obtenues par microscopie confocale au grossissement 40X. la souche de BBc6 utilisée produit de la GFP (en vert), l'ADN extracellulaire et les bactéries ne produisant pas de GFP sont marquées au DAPI (en bleu), les hyphes fongiques sont marqués au WGA 633 (en rouge).

et *P. funiculosum*) et des *Tuberaceae* (*T. melanosporum* et *T. magnatum*) n'ont pas permis la formation de biofilms sur leur hyphes (fig. 6.12).

Il sera nécessaire d'élargir l'analyse à d'autres Ascomycetes afin de confirmer ces observations. De plus de nombreux autres aspects sont à élucider afin de comprendre les mécanismes impliqués dans l'inhibition de l'adhésion et de la formation de biofilm chez ces familles de champignons. Dans ce but, il pourrait par exemple être intéressant de mesurer la production de composés « anti-biofilms » par ces champignons, tel que des antibiotiques ou des DNases (Estrela et Abraham 2016 ; Rajarajan 2013). De plus, l'aspect spécifique de l'inhibition pourrait être vérifiée en testant la formation de biofilms sur ces champignons par d'autres bactéries.

6.3.2 L'énigme des filaments d'ADN

La découverte des filaments contenant de l'ADN au sein des biofilms de l'ensemble des bactéries utilisées dans cette étude soulève beaucoup de questions quant à leurs rôles et composition ainsi que concernant l'origine et la nature de l'ADN qu'ils contiennent. De nombreuses études seront nécessaires pour répondre à ces questions, toutefois quelques observations et résultats préliminaires présentés ici permettent déjà d'apporter quelques pistes et éléments de réflexion.

Selon les souches et les conditions, l'ADN des matrices de biofilms proviendrait soit de la lyse des cellules (Thomas *et al.* 2008 ; Das et Manefield 2012 ; Beltrame *et al.* 2015), soit d'une sécrétion active (Zafra *et al.* 2012 ; Grande *et al.* 2011 ; Liao *et al.* 2014). Dans les biofilms de BBc6 on a pu observer de nombreuses bactéries ne produisant pas de GFP et qui apparaissaient marquées au DAPI (eg.fig. 6.2). Ces bactéries pourraient donc correspondre à des bactéries inactives ou mortes. De plus, des bactéries ne produisant pas de GFP et marquées par le Wheat Germ Agglutinin (WGA)² (fig. 6.13) ont également été observées. Pourtant, le WGA est connu pour se fixer uniquement sur les membranes des bactéries à Gram positif en se liant aux résidus de N-acetylglucosamine de la couche de peptidoglycane qui est inaccessible chez bactéries à Gram négatif (Sizemore *et*

2. Lectine conjuguée à une protéine fluorescente se liant à l'acide sialique et aux résidus de N-Acetylglucosaminy

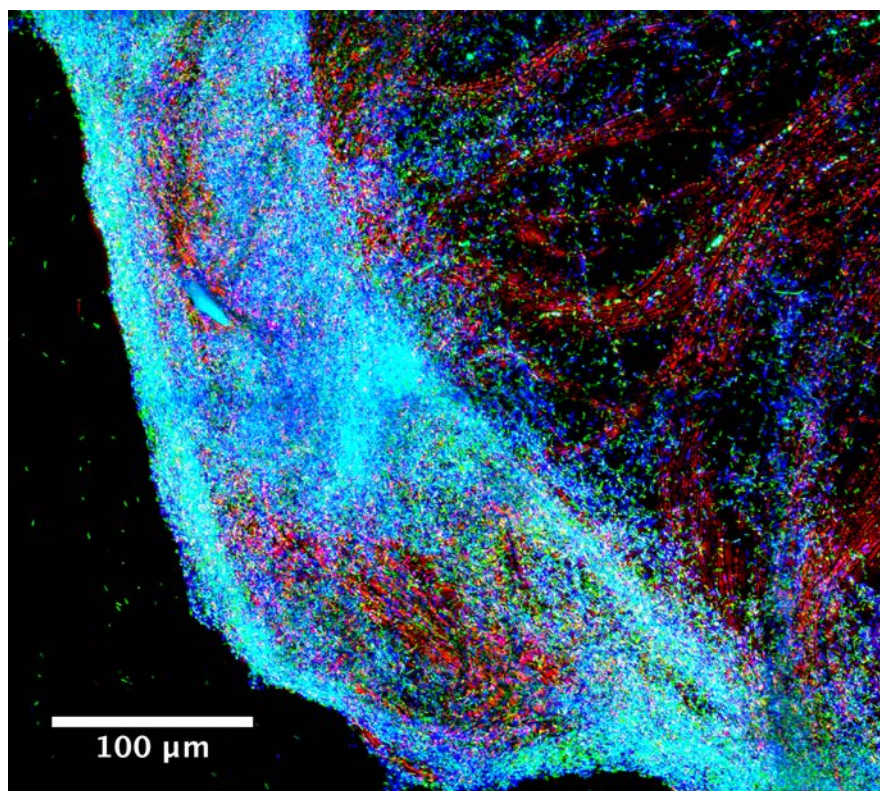


Figure 6.11 – Formation de biofilms par BBc6 sur *M. variabilis*.

Cette image prise après 16 h d'interaction entre BBc6 et *M. variabilis* a été obtenue par projection 2D de coupes optiques obtenues par microscopie confocale au grossissement 40X. La souche de BBc6 utilisée produit de la GFP (en vert), l'ADN extracellulaire et les bactéries ne produisant pas de GFP sont marquées au DAPI (en bleu), le marquage des hyphes fongiques au WGA 633 n'ayant pas fonctionné, les hyphes sont ici visualisés à partir de traitements du fond clair à l'aide du logiciel FIJI et colorés en rouge.

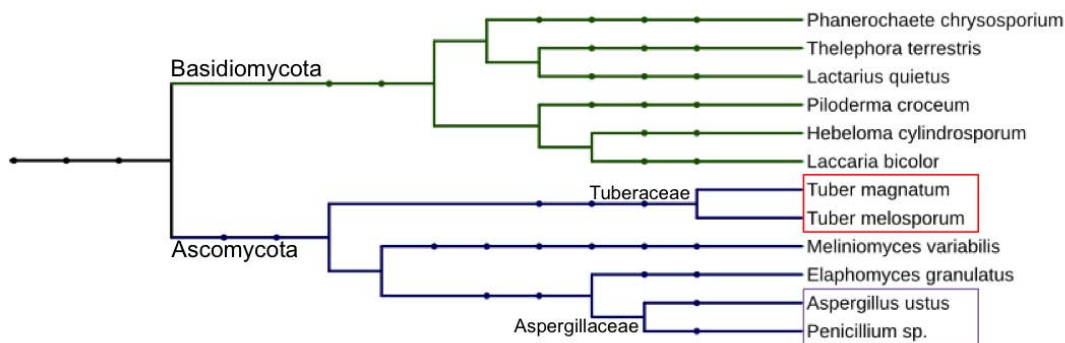


Figure 6.12 – Répartition phylogénétique des souches fongiques testées

Cet arbre phylogénétique a été construit à partir de la base de données taxonomiques du NCBI, en utilisant l'outil en ligne phyloT (<http://phyloT.biobyte.de>). Les souches sur lesquelles BBc6 s'est attachée mais n'a pas formé de biofilms sont encadrées en violet, et celles sur lesquelles n'a été observé ni biofilms ni adhésion sont encadrées en rouge

al. 1990). La plupart des cellules de BBc6 qui étaient marquées au WGA n'étaient par contre pas marquées par le DAPI, ce qui pourrait suggérer que ces cellules ne contenaient plus d'ADN. Elles pourraient donc correspondre à des bactéries mortes partiellement lysées, dont la dégradation de la membrane aurait permis de rendre la couche de peptidoglycane accessible au WGA. La quantité de bactéries mortes et/ou partiellement dégradées pourrait donc être élevée dans les biofilms de BBc6, ce qui pourrait donc aller dans le sens de l'hypothèse d'une origine lytique de l'ADN des filaments. Afin de vérifier la proportion de bactéries mortes il serait nécessaire de procéder à un marquage « LIVE/DEAD ». Une façon intéressante de mesurer l'importance du processus lytique dans les biofilms de BBc6 serait de mesurer dans le milieu les concentrations de composés métaboliques intracellulaires tel que l'Adénosine Triphosphate (ATP) et de les comparer avec une culture planctonique (Barnes *et al.* 2012). Enfin, pour connaître l'origine de l'ADNe contenu dans les filaments, une dernière approche serait d'analyser la nature de l'ADN en question, ainsi si la séquence de l'ADN des filaments est différente de celle de l'ADN génomique cela irait dans le sens d'une sécrétion active.

Selon les souches étudiées, la nature de l'ADNe des matrices de biofilms a été reportée comme similaire (Rose *et al.* 2015 ; Allesen-Holm *et al.* 2006 ; Minh Tran *et al.* 2016) ou différente de l'ADN génomique (Grande *et al.* 2011 ; Steinberger et Holden 2005 ; Böckelmann *et al.* 2006). Cependant, ces études ont été réalisées sur l'ADNe total et non précisément sur les filaments. De plus, la plupart du temps une étape de filtration à 0.2 μm a été effectuée afin de séparer les cellules de l'ADNe. Or, du moins en ce qui concerne BBc6, l'efficacité d'une telle méthode pour l'analyse des filaments d'ADNe semble compromise. En effet, des premiers essais réalisés pour décrocher les cellules de BBc6 des filaments d'ADN n'ont pas été concluants puisque même après de forts traitements mécaniques et chimiques, beaucoup de cellules de BBc6 restent fortement collées sur les filaments (fig. 6.14). Ainsi, les cellules vont probablement retenir les filaments lors de la filtration, ces derniers ne seraient donc pas récupérés dans le filtrat. De plus, même en parvenant à séparer les cellules des filaments, ces derniers resteraient probablement sur le filtre en raison de leur longueur importante (plusieurs centaines de μm , fig. 6.15). Une solution pour éliminer les cellules serait de les lyser, mais il reste dans ce cas à trouver un moyen de séparer l'ADN des cellules lysées de celui des filaments. Au

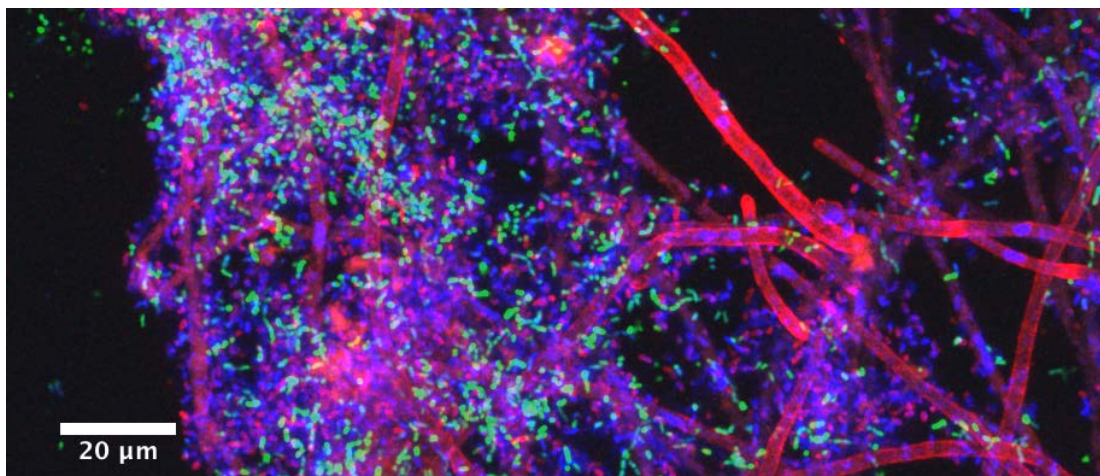


Figure 6.13 – Zoom de la figure 6.13 où sont visibles des bactéries marquées par le WGA. Cette image prise après 16 h d'interaction entre BBc6 et *L. bicolor*, a été obtenue par projection 2D de coupes optiques obtenues par microscopie confocale au grossissement 40X. Elle correspond en fait à un zoom de la figure 6.13 (p.120). La souche de BBc6 utilisée produit de la GFP (en vert), l'ADN extracellulaire et les bactéries ne produisant pas de GFP sont marquées au DAPI (en bleu), les hyphes fongiques (ainsi que certaines bactéries) sont marqués au WGA 633 (en rouge).

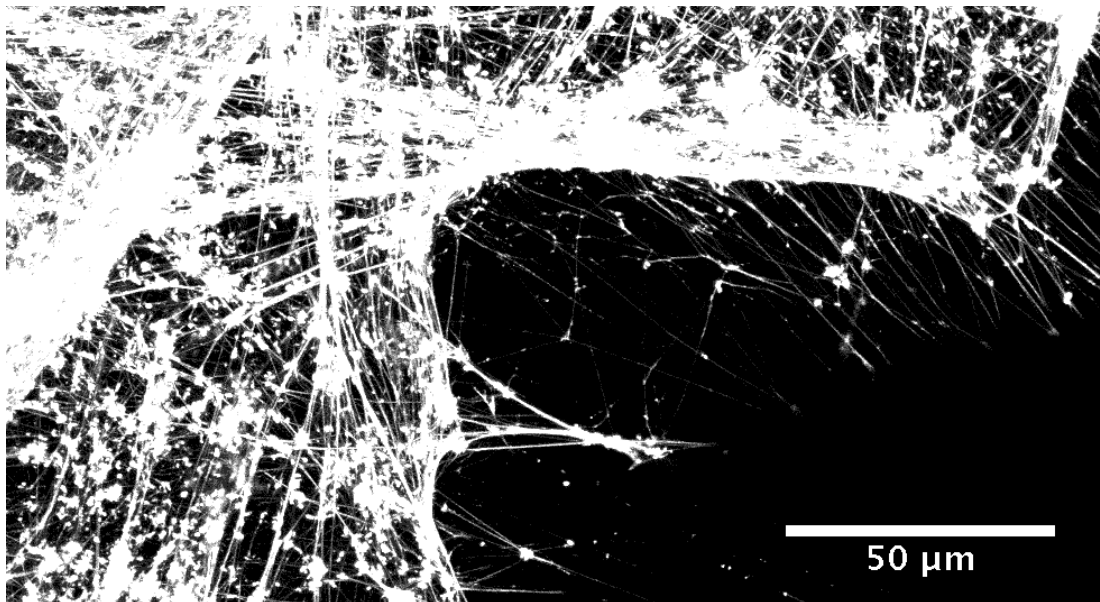


Figure 6.14 – Biofilms de BBc6 après des traitements chimiques et physiques. Des biofilms de BBc6 formés sur des fibres de verre ont été placés 24 h dans une solution très concentrée de chlorure de sodium (1.5 M), puis 1 h dans de l'Éthylène Diamine Tétracétique (EDTA) (0.5 M), et enfin centrifugés à 8000g pendant 10 min dans du NaCl (1.5 M). Cette image a été obtenue par projection 2D de coupes optiques obtenues par microscopie confocale. Les bactéries et les filaments d'ADN sont marqués au DAPI. On observe qu'après ces traitements, beaucoup de bactéries sont encore associées aux filaments

vue de la longueur conséquente des filaments, une séparation basée sur la taille serait envisageable comme par exemple une électrophorèse sur gel d'agarose.

Enfin, parvenir à isoler les filaments permettrait non seulement d'étudier la nature de l'ADN qu'ils contiennent mais également leur composition exhaustive. En effet, il est probable que dans les filaments l'ADN soit associé à d'autres types de molécules telles que des protéines ou des polysaccharides. Il a ainsi par exemple été montré que les filaments d'ADN des biofilms d'une souche d'*Haemophilus influenza* étaient associés à de la piline, une des protéines qui constituent les pili (Gloag *et al.* 2013). Ceux contenus dans les biofilms d'une souche de *P. aeruginosa* ont quant à eux été montrés comme étant recouverts de polysaccharides Psl³ (Wang *et al.* 2015). Afin de vérifier si chez BBc6 des protéines sont nécessaires à la synthèse et la structuration des filaments, des essais ont été réalisés en analysant la formation de biofilm de BBc6 dans un milieu contenant soit de la rifampicine⁴ soit de la tétracycline⁵. Ces derniers sont des antibiotiques qui interfèrent respectivement avec la transcription et la traduction, dans les deux cas la synthèse de protéines est donc inhibée (Campbell *et al.* 2001 ; Brodersen *et al.* 2000). Étonnamment, les biofilms formés dans ces conditions étaient d'apparences similaires à celles du traitement témoin (sans antibiotique) et contenaient des filaments (données non montrées). Ces résultats préliminaires semblent indiquer que la synthèse de protéines ne seraient pas nécessaires à la structure des filaments ni à leur synthèse, et ni à la formation du biofilm de façon générale. Concernant la tétracycline, l'absence d'inhibition de la formation de biofilms a été également confirmée sur surface abiotique par marquage au cristal violet (données non montrées). Il semble toutefois surprenant qu'un processus aussi complexe que celui de la formation de biofilms ne nécessite pas de synthétiser des protéines. Une possibilité est que la synthèse protéique ne soit pas nécessaire à l'initiation du biofilm, et qu'une fois le biofilm initié les cellules soient alors protégées de l'antibiotique. En effet, la formation de biofilms permet aux bactéries de résister aux antibiotiques (Pompilio *et al.* 2015 ; Dufour *et al.* 2012), en partie grâce à l'ADNe matriciel (Mulcahy *et al.* 2008). Dans ce cas, la synthèse protéique étant alors permise il

3. Polysaccharides neutres constitués de glucose, manose et rhamnose trouvés chez *P. aeruginosa*

4. 0.1 mg mL⁻¹ en concentration finale

5. 0.02 mg mL⁻¹ en concentration finale

est possible qu'elle intervienne dans la maturation du biofilm. Afin de vérifier cette hypothèse, une prochaine étape intéressante serait de tester la formation de biofilm par BBc6 dans un milieu contenant de la protéase.

Ces résultats préliminaires, bien qu'ils nécessitent des répétitions et des analyses complémentaires, permettent d'apporter des éléments de réponse et de développer de nouvelles hypothèses concernant les filaments d'ADN et l'inhibition de la formation de biofilms par certains champignons. Cependant, une question importante découlant des résultats de la publication présentée en section 2 n'a pas été abordée ici. En effet, au vu de la localisation des biofilms de BBc6 sur les colonies de *L. bicolor*, il est envisageable que cette dernière soit en lien avec un facteur trophique. Plusieurs analyses ayant été réalisées afin de vérifier cette hypothèse, le prochain chapitre y sera consacré.

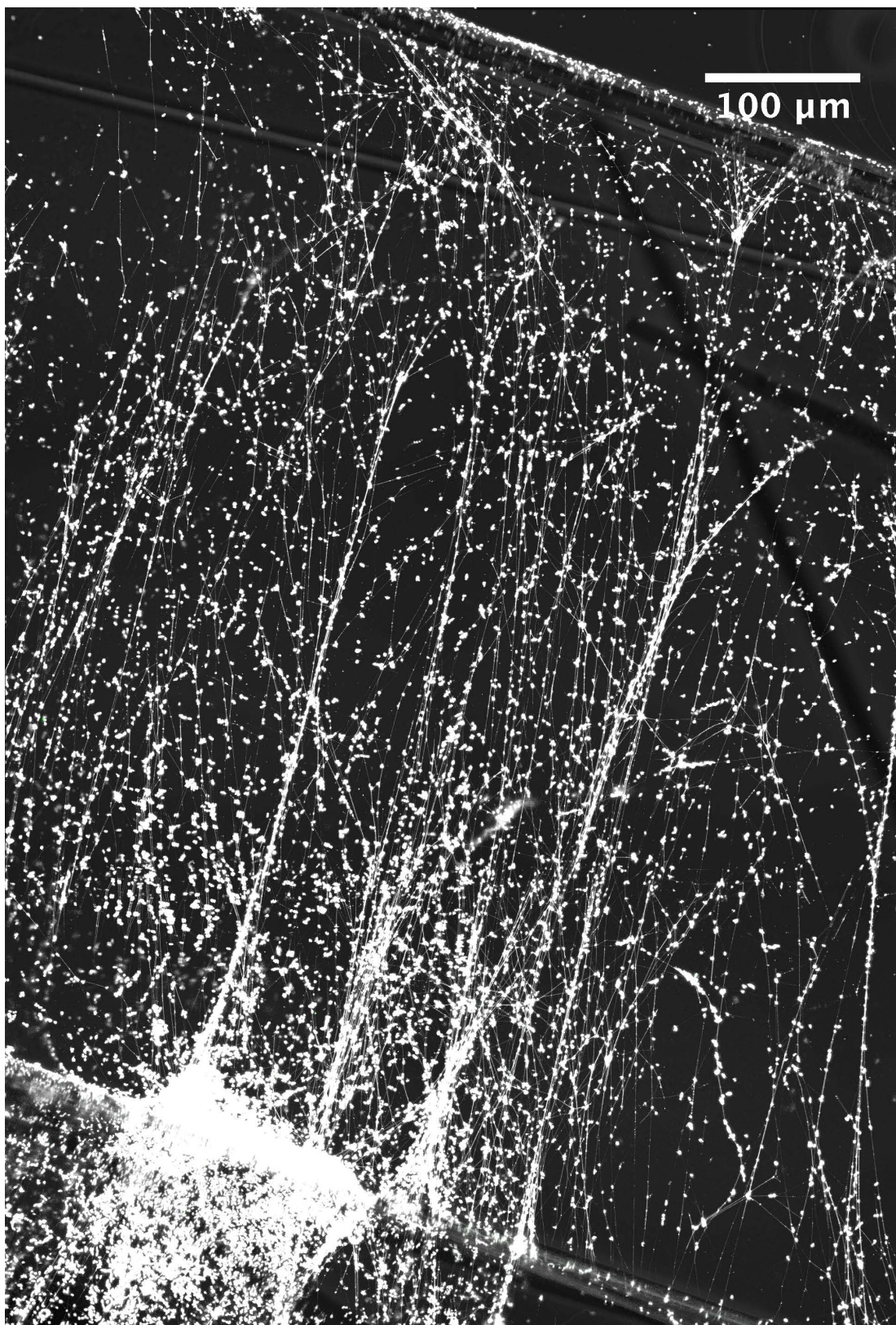


Figure 6.15 – Filaments formés par Bbc6 entre deux fibres de verre.

Cette image correspond à une projection 2D de coupes optiques obtenues par microscopie confocale. L'ADN extra-cellulaire et les bactéries sont marqués au DAPI

Chapitre 7

Des facteurs trophiques influencent-ils la localisation des biofilms de BBc6 sur les colonies de *L. bicolor* ?

7.1 Introduction

Beaucoup de bactéries du sol semblent posséder la capacité à former des biofilms sur certaines colonies fongiques. Il a été observé que ces biofilms se forment préférentiellement dans la zone apicale des hyphes fongiques (cf. Chapitre 5 et 6). Chez la plupart des champignons filamenteux, la zone apicale correspond à la zone active, sécrétant activement des protéines et lieu de la croissance (Taylor et Sinsabaugh 2015 ; Webster et Weber 2007). Il est donc envisageable qu'un (ou des) composé(s) ayant un intérêt nutritif et sécrété(s) au niveau de la zone apicale de *L. bicolor* rende(nt) cette zone particulièrement attractive et propice à la sédentarisation. Nous allons tenter d'éclaircir cet aspect au travers d'expériences complémentaires, toujours en utilisant comme modèle le couple BBc6 / *L. bicolor*, et de résultats issus de la bibliographie.

7.2 *L. bicolor* semble avoir un effet bénéfique sur la croissance de BBc6R8¹ pendant une interaction *in vitro* sur un milieu solide

Tout d'abord, si la localisation des biofilms de BBc6 est due à la sécrétion d'un composé nutritif par *L. bicolor*, ce composé pourrait avoir un effet positif sur la croissance de la bactérie en co-culture. Cependant, si beaucoup d'études montrent les effets des bactéries du sol sur la croissance des ECM (Labbé *et al.* 2014; Founoune *et al.* 2002; Riedlinger *et al.* 2006; Deveau *et al.* 2007), peu en revanche portent sur la réciprocité de ce phénomène. Un effet positif de certains ECM sur la croissance de quelques bactéries a tout de même été reporté. Il a par exemple été montré que la croissance de *Streptomyces sp* AcH 505 et *Pseudomonas putida*, était améliorée respectivement par la présence de *Piloderma croceum* et *Morchella crassipes* (Kurth *et al.* 2013; Pion *et al.* 2013a). Il a de plus été suggéré que des sucres et des acides organiques (en particuliers du tréhalose et de l'acide oxalique) sécrétés par les ECM, pourraient être responsables de la sélection de souches bactériennes au sein de leur mycosphère (De Boer *et al.* 2005; Frey-Klett *et al.* 2005).

Concernant le couple BBc6R8 / *L. bicolor*, il a été montré que la survie de la bactérie dans le sol était augmentée par la présence de l'ECM (Frey-Klett *et al.* 1997; Deveau *et al.* 2010). De plus BBc6R8 est capable d'utiliser comme source de carbone du tréhalose, seul sucre soluble de stockage détecté dans le mycelium de *L. bicolor* (Deveau *et al.* 2008, 2010). L'effet observé sur la survie de BBc6R8 dans le sol pourrait être dû à une augmentation de sa croissance mais aussi à une baisse de sa mortalité. Une expérience a donc été réalisée afin de mettre en évidence un effet éventuel de *L. bicolor* sur la croissance de BBc6R8 via un système d'interaction bipartite sur milieu gélosé en boîte de Petri (fig. 7.1). La croissance de la bactérie, en présence ou en absence du champignon, a été évaluée par une estimation du nombre d'Unité Formant Colonies (UFC) après différents temps d'incubation (4, 8 et 11 jours). Cinq réplicats biologiques de chacune des deux

1. La souche BBc6R8 correspond à un mutant spontané résistant à la rifampicine de la souche d'origine BBc6

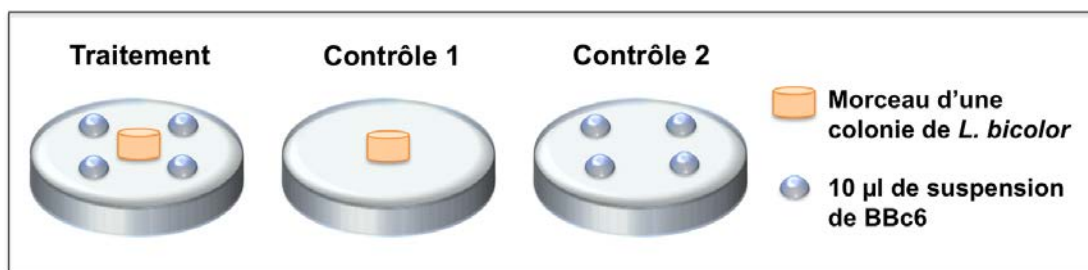


Figure 7.1 – Expérience mise en place pour détecter un effet éventuel de *L. bicolor* sur la croissance de BBc6R8.

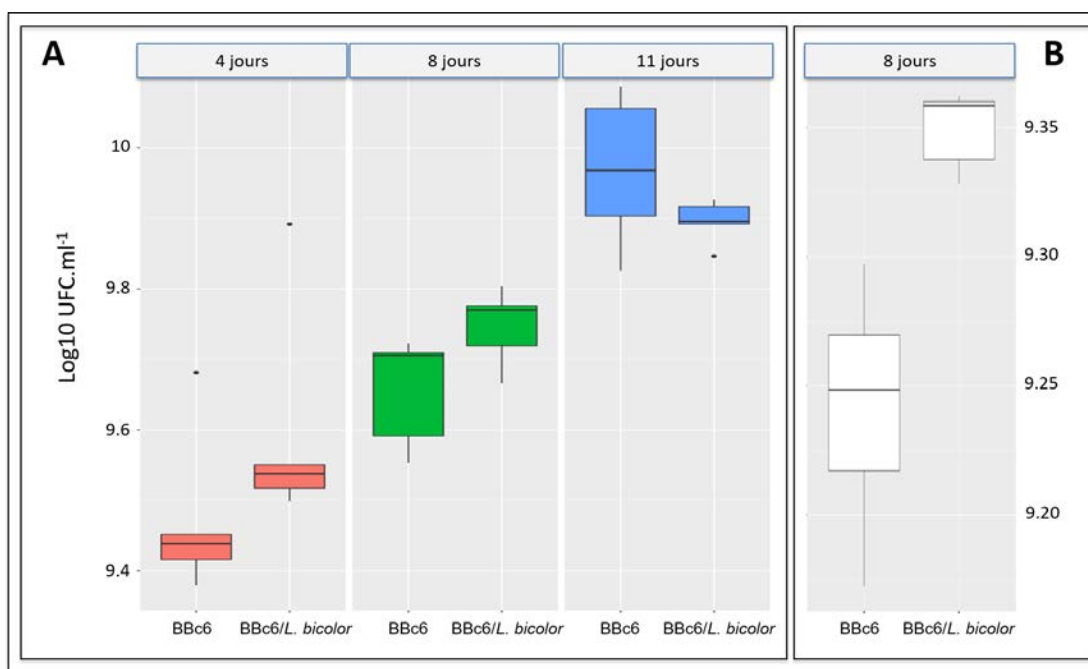


Figure 7.2 – Effet de *L. bicolor* sur la croissance de BBc6R8.

Les bactéries ont été cultivées sur milieu gélosé en présence ou en absence de *L. bicolor*. Puis, les nombres d'UFC ont été déterminés à partir des suspensions des colonies formées. A) UFC obtenues après 4, 8 ou 11 jours d'interaction. B) Second essai uniquement pour 8 jours d'interaction.

conditions ont été analysés en duplicats techniques. Les détails du protocole sont donnés en page 179. Les résultats présentés en fig. 7.2.A montrent un effet positif de *L. bicolor* sur la croissance de BBc6R8. Cet effet n'est que marginalement significatif ($p = 0.059$) et uniquement observé à 8 jours d'incubation mais une répétition (uniquement pour $t = 8$ jours, fig. 7.2.B) a montré un effet positif cette fois-ci très significatif ($p < 0.001$), qui a été confirmé par une troisième répétition (données non montrées). Il est important de noter qu'à 8 jours d'interaction les deux organismes ne sont pas encore en contact, mais espacés d'environ 0.5 cm, l'effet observé serait donc dû à une sécrétion. De plus, le surnageant d'une culture de *L. bicolor* suffit pour avoir cet effet sur la croissance de la bactérie (Deveau et Palin, non publié). Les résultats tendent donc à indiquer que *L. bicolor* sécrète un (ou des) composé(s) ayant un effet positif sur la croissance de BBc6R8.

Ce (ou ces) composé(s) pourrai(en)t être, au moins en partie, responsable(s) de l'effet positif de *L. bicolor* sur la survie de BBc6R8 dans les sols (Deveau *et al.* 2010; Frey-Klett *et al.* 1997). Toutefois, il semble délicat de comparer un effet observé dans le sol à un effet observé sur milieu gélosé. En effet, dans un sol, la présence de poches d'air va fortement limiter le déplacement des bactéries (Schafer *et al.* 1998). Dans ce cas, un effet sur la croissance de BBc6R8 pourrait résulter, de façon non exclusive : 1) d'un facteur direct, via la sécrétion par le champignon d'un composé consommé par la bactérie ; 2) d'un facteur indirect, via l'utilisation des hyphes du champignon par la bactérie comme vecteur de transport pour l'accès à des zones d'intérêt trophique. Sur milieu gélosé le second facteur ne peut pas intervenir, il serait donc intéressant de tester ce facteur via un autre système expérimental. Dans ce but, un dispositif expérimental inspiré de Warmink et Van Elsas (2009) a été utilisé, décrit en figure 7.3. Les détails du protocole sont donnés en page 182. Cependant, cette expérience n'a pas pu aboutir, puisque la croissance du mycelium fongique a été stoppée de façon très nette par l'ajout de la suspension bactérienne (fig. 7.3). Cela pourrait être dû à une forte compétition induite par une concentration bactérienne trop élevée, il serait donc intéressant de renouveler l'expérience avec différentes concentrations bactériennes. Alors que BBc6R8 a surtout été décrite pour ses effets bénéfiques sur la croissance et le taux de mycorhization de *L. bicolor*, ce résultat suggère un fort potentiel compétitif de BBc6R8 sur *L. bicolor*. Un tel effet avait d'ailleurs été précédemment observé

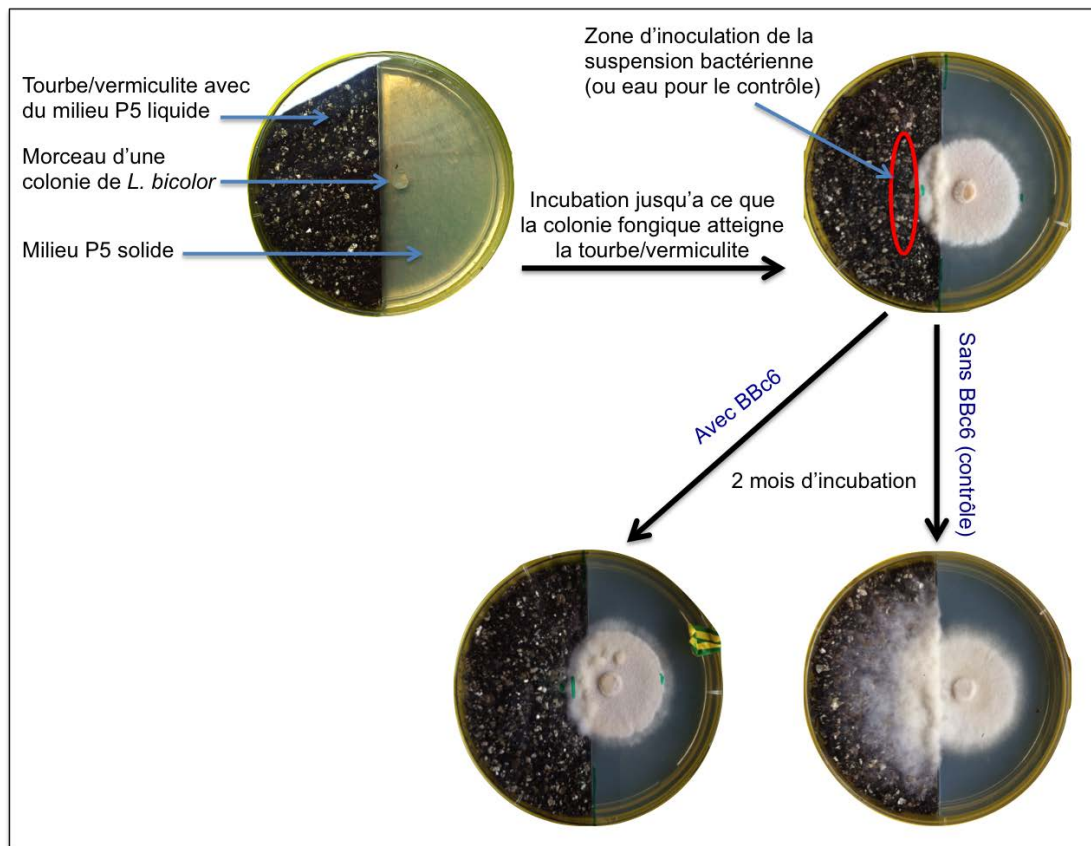


Figure 7.3 – Expérience mise en place pour tester la capacité de BBc6R8 à utiliser les hyphes de *L. bicolor* pour migrer dans le sol

par (Deveau *et al.* 2016a) concernant la compétition pour le Fer. De plus il a également été montré qu'en pépinière BBc6R8 n'avait un effet auxiliaire sur la mycorhization du sapin de Douglas² par *L. bicolor* que lorsqu'elle était à faibles concentrations (Frey-Klett *et al.* 1999). Ces observations nous rappellent que : « *Sola dosis facit venenum* » (Seule la dose fait le poison, Paracelse 1493-1541), et qu'un subtil équilibre détermine la nature des interactions entre les organismes vivants, ce qui rend leur étude *in vitro* particulièrement délicate.

7.3 Lien entre facteurs trophiques et formation de biofilms

7.3. LIEN ENTRE FACTEURS TROPHIQUES ET FORMATION DE BIOFILMS

La zone apicale étant réputée comme un lieu actif de sécrétion chez la majorité des champignons (Taylor et Sinsabaugh 2015 ; Webster et Weber 2007), il est envisageable que le (ou les) facteur(s) impliqué(s) dans l'effet positif de *L. bicolor* sur la croissance de BBc6 et celui (ou ceux) impliqué(s) dans la localisation des biofilms sur les hyphes soit le(s) même(s). Si la localisation spécifique des biofilms de BBc6 est due à un (ou des) composé(s) sécrété(s) par le champignon, ceci implique un chimiotactisme de la bactérie. Un chimiotactisme dirigé vers des hyphes fongiques a déjà été largement reporté pour plusieurs bactéries du sol. Il a par exemple été montré un chimiotactisme de *P. fluorescens* WCS365 et *Burkholderia terrae* BS001 dirigé respectivement vers les hyphes de *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici* et *Lyophyllum* sp. Karsten (De Weert *et al.* 2004 ; Haq *et al.* 2016). Toutefois, un intérêt pour une région spécifique des hyphes n'a jamais été reporté. En ce qui concerne BBc6, un phénomène de chimiotactisme a également été reporté, dirigé vers du mycelium de *L. bicolor* broyé (Deveau *et al.* 2010). Les auteurs ont également montré un chimiotactisme de BBc6 vers du tréhalose, sucre accumulé dans les hyphes de *L. bicolor* et utilisable comme source de carbone par la bactérie. Les auteurs ont donc suggéré que le chimiotactisme de BBc6

2. Conifère natif de l'ouest de l'Amérique du nord, également appelé *Pseudotsuga menziesii*.

vers *L. bicolor* pourrait être dû à du tréhalose soit sécrété activement soit libéré passivement lors de la décomposition d'hyphes morts.

Afin de savoir si une sécrétion active par le champignon est impliquée dans la localisation spécifique des biofilms de BBc6, la formation de biofilms par BBc6 sur des colonies de *L. bicolor* préalablement tuées a été testée. Ainsi, la possibilité de sécrétion active est éliminée. Les colonies de *L. bicolor* ont été tuées par déshydratation progressive à l'éthanol³, puis le protocole utilisé pour la formation des biofilms a été identique à celui utilisé précédemment (chapitre 4). L'analyse des échantillons⁴ a montré une quantité importante de biofilms, cette fois-ci répartis de façon homogène sur les colonies fongiques (fig. 7.4). Cependant, il est apparu que la structure des hyphes était fortement perturbée par le traitement à l'éthanol, puisque des boursoufflures étaient visibles sur les hyphes (fig. 7.5). Ainsi, en plus d'empêcher une sécrétion active, le traitement à l'éthanol a également pu provoquer la libération d'une quantité importante de métabolites (dont du tréhalose) via les hyphes abîmés par le traitement. Ceci aurait ainsi favorisé la formation de biofilms par la bactérie sur l'ensemble de la colonie fongique. Pour cette raison il n'est pas possible de conclure quant à l'existence d'un composé sécrété par *L. bicolor* qui serait responsable du positionnement des biofilms de BBc6 sur la zone apicale. Il apparaît pour cela nécessaire de trouver un moyen de tuer les colonies fongiques sans altérer la structure des hyphes. En revanche, ces résultats indiquent qu'il est possible pour BBc6 de former des biofilms sur l'ensemble de la colonie fongique et que leur positionnement peut être influencé par des métabolites produit par *L. bicolor*. Fait intéressant, une différence de colonisation bactérienne entre des hyphes fongiques morts et vivants avait déjà été observée lors d'études précédentes. Par exemple, une souche de *B. cereus* a été montrée comme s'associant mieux au hyphes morts de *Glomus spp.* tandis qu'une souche de *Paenibacillus brasilensis* montre une nette préférence pour les hyphes vivants du même champignon (Toljander *et al.* 2006).

3. Les colonies fongiques ont été placées 10 min dans des bains de concentrations croissantes en éthanol : 20%, 50%, 70% et enfin 90%. Puis elles ont été rincées trois fois dans du tampon potassium phosphate (pH 5.8)

4. L'analyse a été réalisée en triplicats

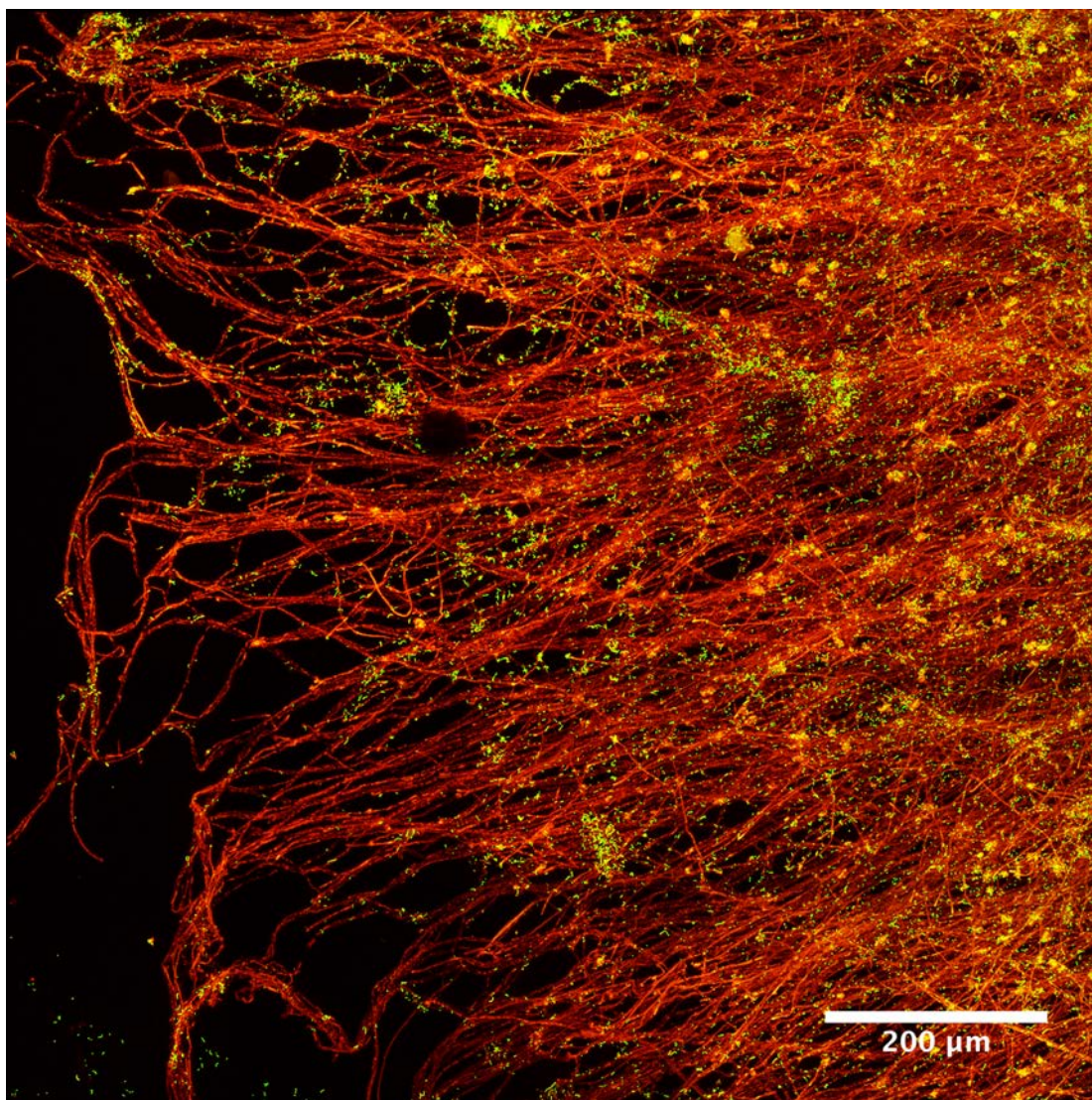


Figure 7.4 – Biofilms de BBc6 sur des colonies de *L. bicolor* tuées par déshydratation à l'éthanol.

Cette image a été prise après 6 h d'interaction entre BBc6 et *L. bicolor* préalablement tué par déshydratation progressive dans de l'éthanol (succession de bains de 10 min dans de l'éthanol à 20%, 50%, 70% et 90%). Elle a été obtenue par projection 2D de coupes optiques obtenues par microscopie confocale au grossissement 40X. La souche de BBc6 utilisée produit de la GFP (en vert) et les hyphes fongiques sont marqués au WGA 633 (en rouge)

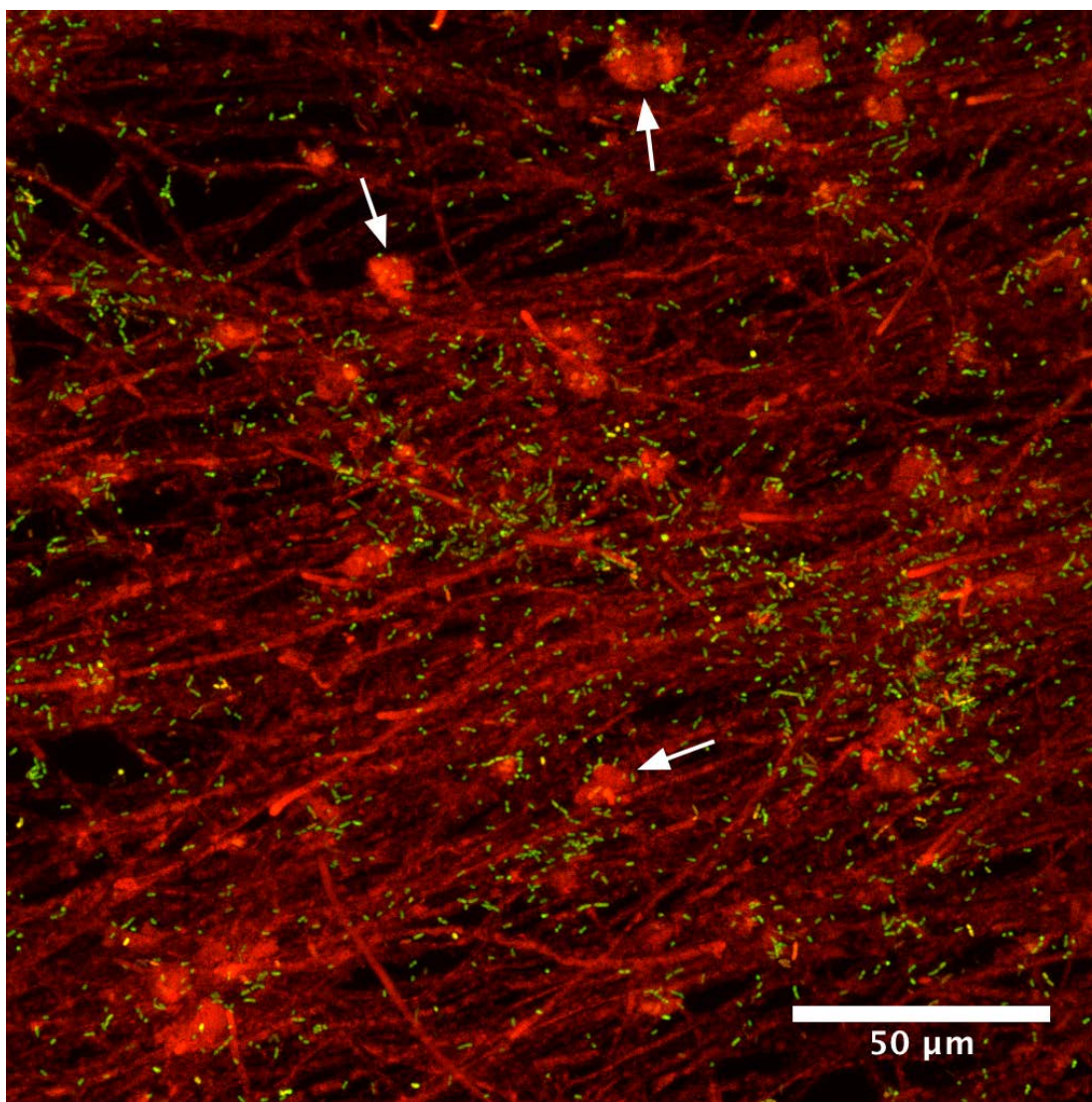


Figure 7.5 – Structures visibles sur les hyphes de *L. bicolor* tués par déshydratation à l'éthanol. Cette image a été prise après 6 h d'interaction entre BBc6 et *L. bicolor* préalablement tué par déshydratation progressive dans de l'éthanol (succession de bains de 10 min dans de l'éthanol à 20%, 50%, 70% et 90%). Elle a été obtenue par projection 2D de coupes optiques obtenues par microscopie confocale au grossissement 40X. La souche de BBc6 utilisée produit de la GFP (en vert) et les hyphes fongiques sont marqués au WGA 633 (en rouge). Les flèches blanches indiquent des structures globulaires présentes sur les hyphes

CHAPITRE 7. DES FACTEURS TROPHIQUES INFLUENCENT-ILS LA LOCALISATION DES BIOFILMS DE BBc6 SUR LES COLONIES DE *L. bicolor* ?

Table 7.1 – Concentrations de différents acides organiques dans un milieu de culture de *L. bicolor* (Cumming *et al.* 2001) et utilisation de certains de ces acides comme source de carbone par BBc6R8 (Deveau *et al.* 2010)

Acide organique	Concentrations dans une culture de <i>L. bicolor</i> (µM)	DO de BBc6R8 en galerie Biolog [®]
Tartrate	32.00	
Malate	12.10	
Glycolate	42.40	
Formate	93.60	0.27
Lactate	65.30	0.97
Acetate	106.00	0.48
Succinate	92.70	0.96
Unknown 1	3.53	
Unknown 2	16.40	
Unknown 3	9.39	
Oxalate	3.00	
D-trehalose		0.75

Un autre fait intéressant est la localisation des biofilms de BBc6 dans un système symbiotique *L. bicolor*/ Peuplier. Il a été observé que dans un tel système, la localisation préférentielle des biofilms n'était plus la zone apicale de la colonie fongique mais les hyphes au voisinage des racines de la plante, ou ceux inclus dans la mycorhize (fig. 6.3 page 95). Or, il a été montré que le tréhalose était fortement accumulé dans les hyphes situés à l'interface plante / ECM (Nehls *et al.* 2010). Le tréhalose est donc ici aussi un bon candidat pour expliquer la localisation des biofilms de BBc6 sur *L. bicolor*. Cependant, il est intéressant de noter qu'une localisation similaire des biofilms sur les colonies de *L. bicolor* a été observée pour l'ensemble des souches bactériennes testées dans cette étude (cf. tab. 6.1, p.99), bien que de phyla et fonctions écologiques très différentes. Pourtant, la capacité à dégrader le tréhalose n'est pas particulièrement répandue chez les bactéries, il est même suggéré que le tréhalose permettrait une sélection des bactéries dans la mycosphère des ECM (Frey *et al.* 1997). Il est aussi tout à fait possible que les facteurs intervenant dans la localisation des biofilms sur la zone apicale des colonies fongiques et sur les mycorhizes soit différents. D'autres sucres pourraient intervenir dans la localisation des biofilms bactériens, tels que le glucose et le galactose, qui sont également sécrétés par *L. bicolor* (données non

montrées). De plus, la zone apicale des champignons filamenteux est réputée pour être le lieu d'une sécrétion active de nombreux acides organiques en raison de leur implication dans les processus de dissolution des minéraux (Courty *et al.* 2010). Une étude réalisée par Cumming *et al.* (2001) a permis d'obtenir les concentrations de différents acides organiques présents dans un milieu de culture de *L. bicolor* (tab. 7.1). Les 4 acides organiques dominants étaient les acides acétique, formique, succinique et lactique. La capacité de BBc6R8 à utiliser différents substrats pour croître avait été testée en galerie Biolog[®] par Deveau *et al.* (2010). Fait intéressant, les 4 acides organiques montrés par Cumming *et al.* (2001) comme étant les plus abondants dans le milieu de culture de *L. bicolor* sont utilisables comme sources de carbone par BBc6R8 (tab. 7.1). De plus, deux d'entre eux, les acides succinique et lactique, ont même montré un effet supérieur au tréhalose sur la croissance de BBc6R8. Au vu de ces observations, une sécrétion d'acides organiques pourrait donc être responsable du positionnement des biofilms dans les régions apicales des colonies fongiques.

Enfin, même si certains résultats semblent indiquer que le positionnement des biofilms pourrait être influencés par des facteurs trophiques, il paraît évident que d'autres facteurs interviennent. En effet, une répartition hétérogène fut également observée sur des surfaces abiotiques. Sur fibres de verre, certaines fibres apparaissaient recouvertes d'épais biofilms, tandis que d'autres dans sa proximité étaient totalement exemptes de bactéries (fig. 7.6), ce qui pourrait faire penser à un facteur aléatoire. Sur fibres de nylon (fig. 7.7), les biofilms de BBc6 furent observés principalement en bordure des coupons de fibres, de façon assez similaire à ce qui était observé sur les colonies de *L. bicolor*. Cette observation pourrait indiquer l'influence d'un facteur d'encombrement spatial, la bactérie préférant s'installer dans des régions moins dense en hyphes (ou en fibres). Une question d'aspérité du support est également posée. En effet les bordures des coupons de nylon présentent de nombreuses cassures issues de leur découpe, et les biofilms semblent s'y amarrer. Enfin de façon intéressante, lors de l'étape d'adhésion qui initie la formation de biofilms, les cellules de BBc6 apparaissent attachées aux hyphes de l'ensemble de la colonie fongique, sans localisation préférentielle⁵. Il semble donc

5. Données non montrées.

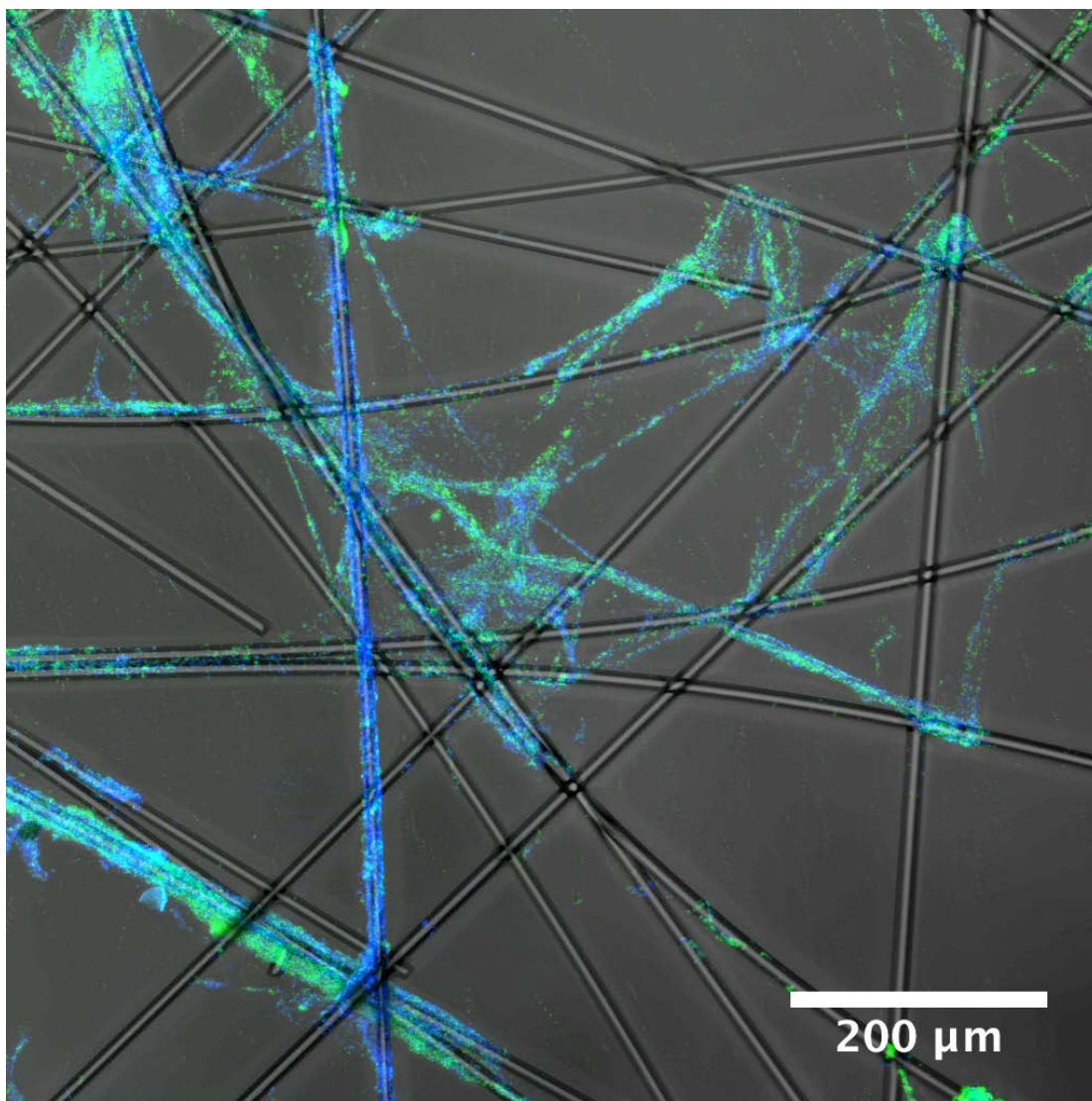


Figure 7.6 – Hétérogénéité des biofilms de BBc6 sur fibres de verre.

Cette image prise après 16 h de formation de biofilms par BBc6 sur des fibres de verre, a été obtenue par projection 2D de coupes optiques obtenues par microscopie confocale au grossissement 40X. La souche de BBc6 utilisée produit de la GFP (en vert) et l'ADN extra-cellulaire ainsi que les bactéries ne produisant plus de GFP sont marqués au DAPI (en bleu). Les fibres de verre sont visualisées avec le fond clair.

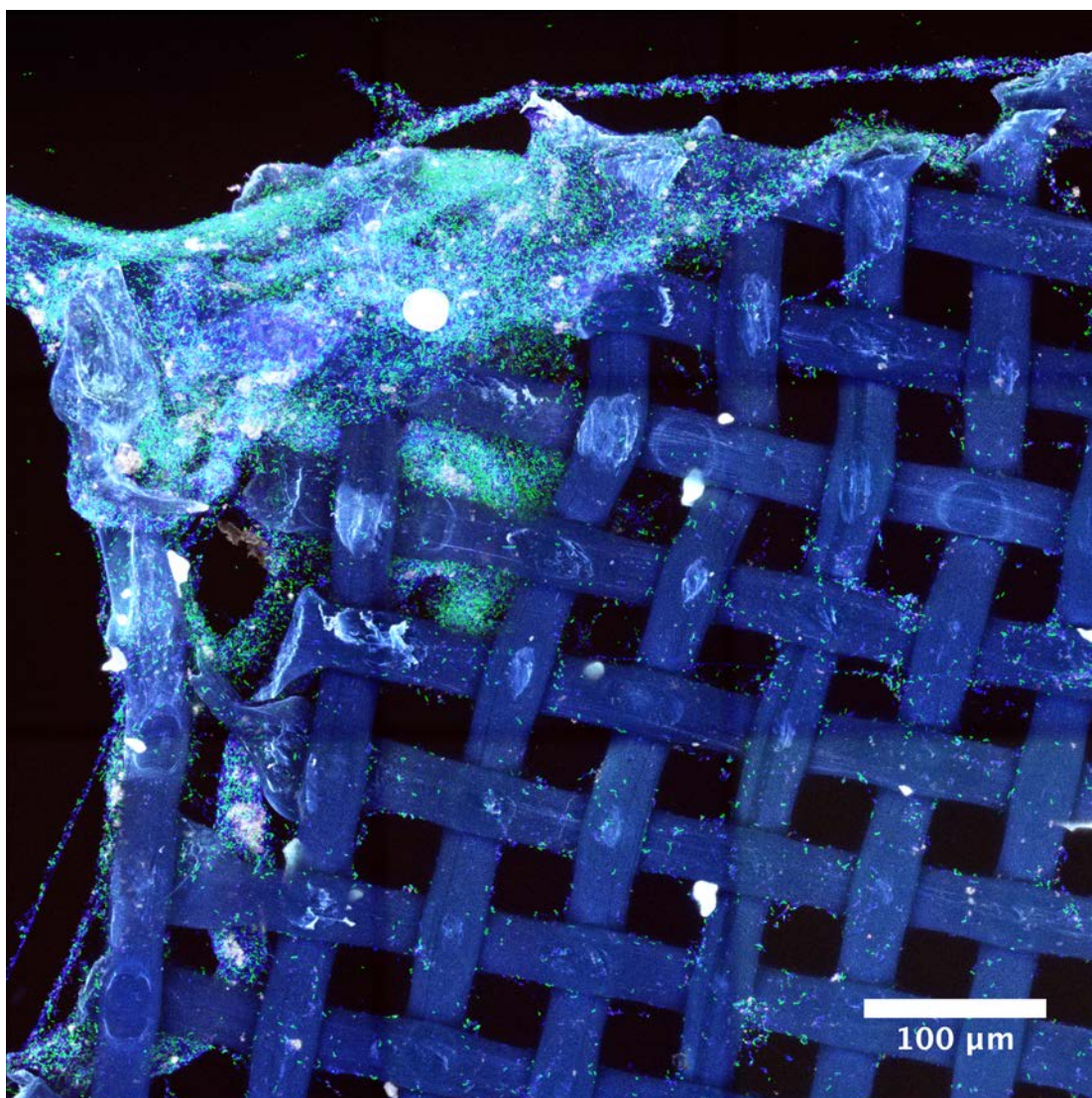


Figure 7.7 – Formation de biofilms par BBc6 sur une membrane de nylon.

Cette image prise après 16 h de formation de biofilms par BBc6 sur des coupons de fibres de nylon, a été obtenue par projection 2D de coupes optiques obtenues par microscopie confocale au grossissement 40X. La souche de BBc6 utilisée produit de la GFP (en vert) et l'ADN extra-cellulaire ainsi que les bactéries ne produisant plus de GFP sont marqués au DAPI (en bleu). Les fibres de nylon sont visualisées par auto-fluorescence (en bleu).

que le ou les facteur(s) intervenant dans la localisation apicale des biofilms de BBc6, n'influe(nt) que sur la formation du biofilm à proprement parlé. Les cellules vont donc au départ se répartir de façon homogène, puis les biofilms ne se développeront que dans des zones d'intérêts particulières, peut-être en réponse à un signal émis par les bactéries pionnières.

7.4 Conclusions et perspectives

7.4. CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

Ces quelques résultats préliminaires associés à ceux issus de la littérature renforcent l'hypothèse de l'influence d'un facteur trophique sur le positionnement des biofilms bactériens sur les colonies de *L. bicolor*. Toutefois ces résultats restent à confirmer et de nombreux aspects restent à éclaircir. L'effet trophique de *L. bicolor* sur BBc6 pourrait par exemple être vérifié par la mise en évidence de transfert de carbone via un marquage au ^{13}C . L'implication du tréhalose pourrait être examinée via le suivi de l'expression du gène de la tréhalase chez BBc6 pendant son interaction avec *L. bicolor*. Il serait également intéressant de comparer l'expression de ce gène entre des bactéries planctoniques, des bactéries en biofilms sur une colonie fongique et des bactéries en biofilms sur une mycorhize. L'étude de la formation de biofilms sur hyphes morts pourrait apporter des informations quant au caractère actif ou passif de la libération du (ou des) facteur(s) impliqué(s), toutefois il est nécessaire de trouver une façon de tuer les hyphes sans altérer leur structure. Il serait par exemple intéressant de tester une fixation des hyphes au paraformaldéhyde. En ce qui concerne l'hypothèse du facteur d'encombrement spatial, une première approche intéressante serait de trouver une surface abiotique de structure très similaire aux colonies de *L. bicolor*⁶, et d'analyser la formation de biofilms par BBc6 sur cette surface. Enfin, la formation de biofilms pouvant être impliquée dans l'interaction entre bactérie et champignon (Hogan *et al.* 2007), il semble légitime de se demander si la formation de biofilms sur les hyphes de *L. bicolor* est nécessaire à l'effet auxiliaire de BBc6. Cet aspect sera discuté dans le prochain chapitre.

6. Fibres denses en disposition radiale.

Chapitre 8

Formation de biofilms et effet auxiliaire de la mycorhization

8.1 Introduction

Dans le modèle théorique de l'interaction mutualiste entre BBc6 et *L. bicolor*, présenté dans la figure 2.2 (page 36), une étape de formation de biofilms était déjà suggérée. La capacité de BBc6 à former des biofilms sur les hyphes de *L. bicolor* a par la suite été confirmée (cf. chapitre 4 et 6). Puisque dans un biofilm bactérien formé sur des hyphes fongiques, la proximité des cellules bactériennes et fongiques peut faciliter le transfert de molécules de signalisation ainsi que les échanges métaboliques (Toljander *et al.* 2006), cette étape d'interaction physique pourrait être une étape clé dans l'interaction entre ces deux organismes. Si tel est le cas, alors une perte de la capacité de BBc6 à former des biofilms devrait avoir un effet négatif sur son effet auxiliaire. Or il se trouve que des mutants de la souche BBc6R8¹ (tab. 8.1) qui avait été identifiés en amont de cette thèse comme ayant perdu leur effet auxiliaire (fig. 8.1 ; Cusano *et al.* (2011) ; Labbé, non publié), sont mutés au niveau de gènes déjà reportés dans la littérature comme pouvant être impliqués dans la formation de biofilms d'autres souches bactériennes. Il est donc possible que la perte de leur effet auxiliaire soit en lien avec une perte ou une diminution de leur capacité à former des biofilms. Cela concerne les mutants de gènes codant les systèmes de sécrétion de type III (T3SS) ainsi que la protéine MorA. Une analyse de la capacité de ces mutants à former des biofilms a donc été réalisée et est présentée dans ce chapitre.

1. La souche BBc6R8 correspond à un mutant spontané résistant à la rifampicine de la souche d'origine BBc6

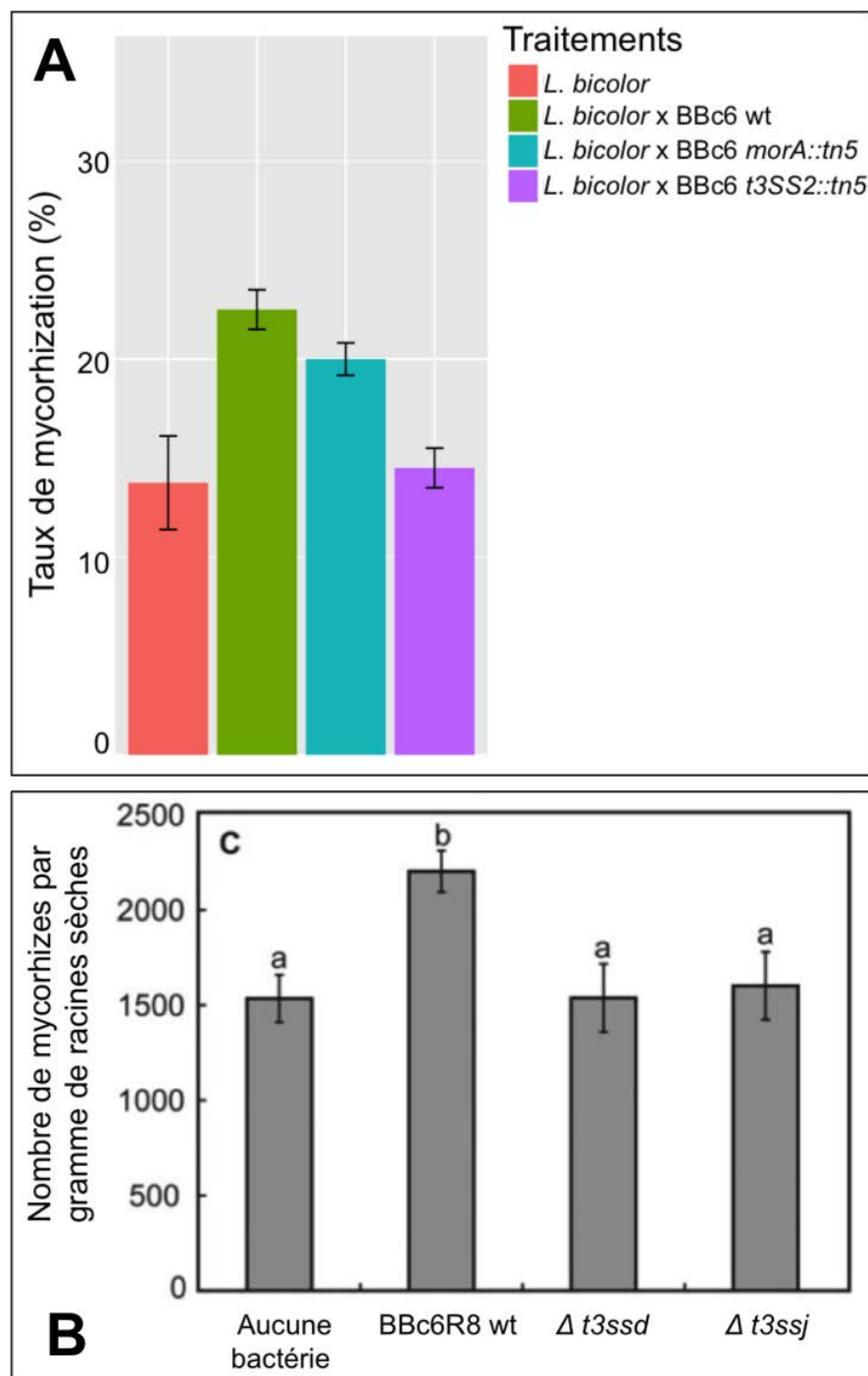


Figure 8.1 – Effet de BBc6R8 et de ses mutants sur le taux de mycorhization de *L. bicolor*

A) Effets de BBc6R8 et certains de ses mutants sur le taux de mycorhization de *L. bicolor* avec le Peuplier. Cette figure a été réalisée d’après les données de Jessy Labbé (non publiées). B) Effets de BBc6R8 et certains de ses mutants sur la mycorhization de *L. bicolor* avec le Sapin de Douglas. Cette figure est issue de la publication de Cusano *et al.*, 2011 (traduite en français).

Nom du mutant	Gène muté	Produit du gène muté	Référence
<i>morA</i> :: <i>tn5</i>	<i>morA</i> (MHB_004640)	Diguanylate cyclase/ phosphodiesterase	Galet et al., non publié
<i>t3SS2</i> :: <i>tn5</i>	<i>hrcJ</i> (MHB_001885)	protéine régulatrice du T3SS2	Galet et al., non publié
$\Delta t3SSD$ $\Delta t3SSJ$	Cluster <i>rscS</i> , <i>rscR</i> , <i>rscT</i> (HM752578.1)	protéine formant le ca- nal central de l'appa- reil de translocation du T3SS	Cusano et al., 2011

Table 8.1 – Mutants de la souche BBc6R8 utilisés dans cette étude

8.1.1 Zoom sur le système de sécrétion de type III

Le T3SS est un complexe transmembranaire, très répandu chez les bactéries à Gram négatif et qui constitue une « seringue moléculaire » (fig. 8.2). Bien qu'impliqué dans une large gamme d'interactions bactéries / Eucaryotes, allant de la pathogénicité à la symbiose (Coombes 2009), ce système a surtout beaucoup été étudié pour son rôle dans les interactions pathogènes impliquant des animaux ou des plantes. Dans ce type d'interactions le T3SS permet l'attachement aux cellules Eucaryotes, ainsi que d'y injecter des effecteurs. Très peu d'études se sont en revanche intéressées à son rôle dans les interactions bactéries / champignons. Il a pourtant été montré que la fraction de bactéries équipées d'un T3SS est enrichie dans la mycosphère de *L. proxima* (13.4%) par rapport au sol nu environnant (2.8%) (Warmink et Van Elsas 2008). De même, un enrichissement de *Pseudomonas* pourvues du T3SS a été observé dans la mycorrhizosphere de *Medicago truncatula* par rapport à la rhizosphère et au sol nu (Viollet *et al.* 2011). Ces observations suggèrent que le T3SS pourrait donc être fortement impliqué dans les interactions entre les bactéries et les champignons du sol. Cela a d'ailleurs déjà été montré, par exemple dans le cas de la relation symbiotique entre *Burkholderia rhizoxinica* and *Rhizopus microsporus* (Lackner *et al.* 2010), ou bien dans celui de l'interaction entre une souche de *Burkholderia terrae* et deux champignons du sol (Yang *et al.* 2016). Enfin, plusieurs études semblent indiquer que le T3SS régulerait de façon négative la formation de biofilms. En effet, il a par exemple été montré que des mutations de gènes codant le T3SS chez une souche de *P. aeruginosa* et de *Yersinia pseudotuberculosis* résultent en une augmentation de leur

formation de biofilms (Kuchma *et al.* 2005 ; Atkinson *et al.* 2011). Cependant, de façon intéressante, il a aussi été montré que le T3SS était nécessaire à la formation de biofilms par une souche de *P. aeruginosa* sur des monocouches de cellules épithéliales (Tran *et al.* 2014). Ces auteurs ont également montré que dans ce cas, ce ne sont pas les effecteurs du T3SS mais son appareil de translocation² qui serait impliqué, via la formation de pores dans la cellule hôte qui permettraient la libération de facteurs induisant la formation de biofilms. Les mutants $\Delta t3ssd$ et $\Delta t3ssj$ utilisés ici (tab. 8.1) sont deux mutants par délétion complète issus de la même transformation (Cusano *et al.* 2011). Ils sont mutés au niveau d'un gène codant le complexe qui forme le canal central du translocon (fig. 8.2). L'utilisation de deux mutants différents mutés pour le même gène permet de vérifier que les effets observés sont bien dus à l'inactivation du gène et non pas à une seconde mutation.

Chez plusieurs souches bactériennes la présence d'un opéron codant un second T3SS (T3SS2) a été détectée. C'est par exemple le cas chez une souche d'*Escherichia coli* (Preston 2007) et de *P. syringae* (Gazi *et al.* 2012), et c'est également le cas chez BBc6 (Deveau *et al.* 2014a). Ce deuxième T3SS est supposé non fonctionnel, l'opéron correspondant apparaissant tronqué (Ren *et al.* 2004). Cependant chez une souche d'*E. coli* et de *Vibrio parahaemolyticus* des mutations de gènes codant le T3SS2 ont engendré une modification de leur pathogénicité (Park *et al.* 2004 ; Ideses *et al.* 2005), ce qui suggère que chez ces bactéries le T3SS2 pourrait être fonctionnel. De façon intéressante, un mutant de la souche BBc6R8 muté au niveau d'un gène régulateur du T3SS2 ($t3ss2 :: tn5$, tab. 8.1) a été montré comme ayant perdu son effet auxiliaire. Ceci suggère donc que le T3SS2 serait également fonctionnel chez BBc6. Le mutant $t3ss2 :: tn5$, a donc été inclus dans l'analyse présentée ici. Il provient d'une banque de mutants générés par insertions aléatoires de transposons *tn5*.

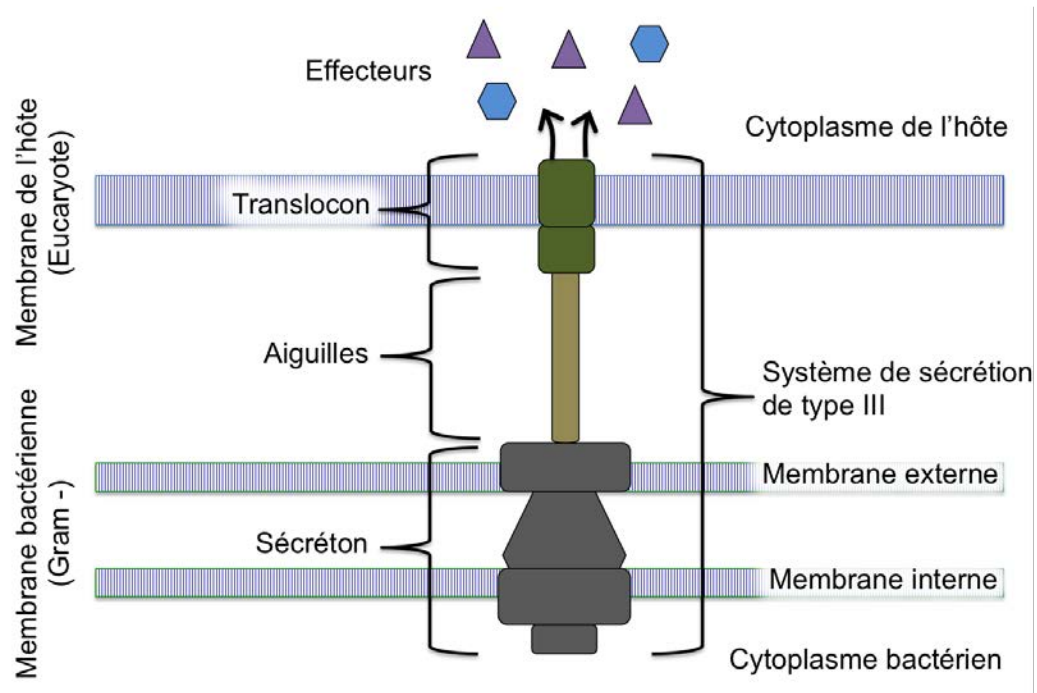


Figure 8.2 – Système de sécrétion de type III

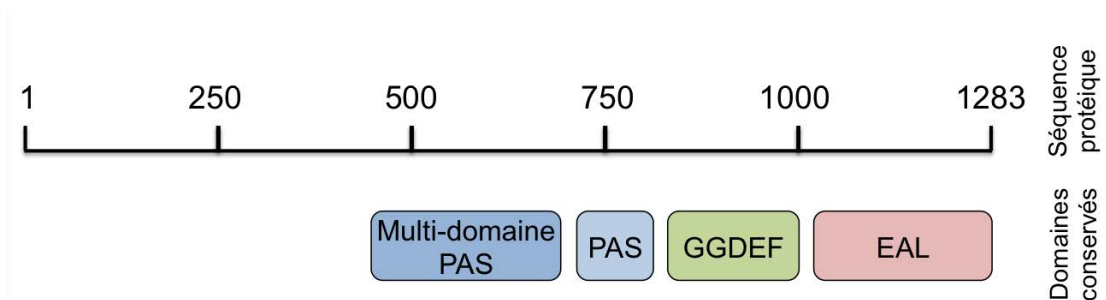


Figure 8.3 – Domaines de la protéine MorA de BBc6

Ces domaines conservés ont été détectés à partir de la séquence du gène codant la protéine MorA de BBc6, à l'aide de l'outil "conserved domains" de la plate-forme NCBI. Les domaines PAS, se lient spécifiquement à des ligands, et constituent des senseurs impliqués dans la transduction de signal en réponse notamment à l'oxygène ou la lumière. Les domaines GGDEF possèdent une activité de diguanylate cyclase tandis que les domaines EAL possèdent une activité de diguanylate phosphodiesterase, ces deux domaines vont donc contribuer respectivement à la synthèse et la dégradation de di-GMPc.

8.1.2 Zoom sur la protéine MorA

La protéine MorA quant à elle est une protéine transmembranaire très conservée chez les bactéries du genre *Pseudomonas* (Choy *et al.* 2004). Elle possède deux sous-unités catalytiques avec des activités opposées (fig. 8.3), un domaine GGDEF (diguanylate cyclase) et un domaine EAL (phosphodiesterase), qui permettent respectivement la synthèse et la dégradation de di-GMPc (Phippen *et al.* 2014). Cette protéine est donc impliquée dans la régulation du taux cellulaire de di-GMPc, qui est lui même en lien avec la formation de biofilms. En effet le di-GMPc est une molécule de signalisation qui coordonne la transition entre l'état sessile et planctonique des bactéries et inversement. Des concentrations élevées en di-GMPc vont favoriser la formation de biofilms alors que des faibles concentrations vont augmenter la motilité (Valentini et Filloux 2016). La protéine MorA a par exemple été montrée comme étant impliquée dans la formation de biofilms d'une souche de *P. aeruginosa* et de *P. putida* (Choy *et al.* 2004 ; Meissner *et al.* 2007 ; Phippen *et al.* 2014). Chez ces souches, des mutations du gène codant la protéine MorA ont engendré une réduction de leur formation de biofilms (Choy *et al.* 2004). Une augmentation de la mobilité ainsi qu'une surproduction de flagelles ont également été reportées dans le cas de *P. putida*. Le mutant *morA :: tn5* (tab. 8.1) utilisé dans l'étude présentée ici provient de la même banque de mutants générés par insertions aléatoires de transposons *tn5* que le mutant *t3ss2 :: tn5*.

8.2 Formation de biofilms par des mutants de BBc6R8 ayant perdu leur effet auxiliaire

8.2.1 Analyse de la formation de biofilms sur surface abiotique par la méthode de marquage au cristal violet

Dans un premier temps, les mutants ont été testés pour leur capacité à former des biofilms sur des surfaces abiotiques. Pour cela, la densité des biofilms formés

2. Partie extracellulaire du T3SS

dans des microplaques en polystyrène a été mesurée après 48h par une méthode classique de marquage des biofilms au cristal violet puis lecture de la densité optique correspondante (Merritt *et al.* 2011). Le protocole détaillé est donné en page 182.

Les résultats obtenus ont montré qu’aucun des mutants n’était affecté négativement dans sa formation de biofilms. Au contraire, l’ensemble des mutants semble même avoir formé des biofilms plus denses que la souche sauvage (fig. 8.4). Ceci est en accord avec ce qui avait été reporté dans la littérature concernant des mutants du T3SS. Par contre, concernant MorA un effet inverse avait été reporté puisque des mutants du gène *morA* chez *P. aeruginosa* et *P. putida* étaient affectés négativement dans leur capacité à former des biofilms (Choy *et al.* 2004). Toutefois, les mutants utilisés dans ces études étaient issus de mutations par délétion complète, tandis que le mutant de BBc6R8 est un mutant par insertion de transposons *tn5* dont le site précis d’insertion est inconnu pour l’instant. Ainsi, si le *tn5* est inséré au niveau de la région codant le domaine EAL, puisque ce domaine est situé à l’extrémité C-terminale, il est possible que le gène soit tout de même exprimé, générant des protéines tronquées possédant uniquement l’activité de diguanylate cyclase. Ceci pourrait donc se traduire par une augmentation de la production de di-GMPc, induisant une augmentation de la formation de biofilms. Des analyses supplémentaires seront donc nécessaires pour tester cette hypothèse. De plus, en ce qui concerne les mutants par insertion de *tn5* (*t3ss2 :: tn5* et *morA :: tn5*), afin de s’assurer que les effets observés sont bien dus à la mutation des gènes concernés, des complémentations de ces mutants seront nécessaires.

Si la formation de biofilms est bien impliquée dans l’effet auxiliaire de BBc6, il peut au premier abord paraître surprenant que des mutants formant plus de biofilms perdent leur effet sur la mycorhization de *L. bicolor*. Cependant, nous avons déjà vu au chapitre précédent que BBc6 avait un fort potentiel compétitif sur *L. bicolor*, une forte concentration bactérienne induisant une inhibition de la croissance du champignon. Ainsi, une augmentation de la formation de biofilm pourrait faire basculer le type d’interaction existant entre les deux partenaires, l’effet de compétition prenant le dessus sur l’effet auxiliaire. De plus, ce qui nous apparaît ici comme un biofilm plus dense peut résulter d’une modification de la

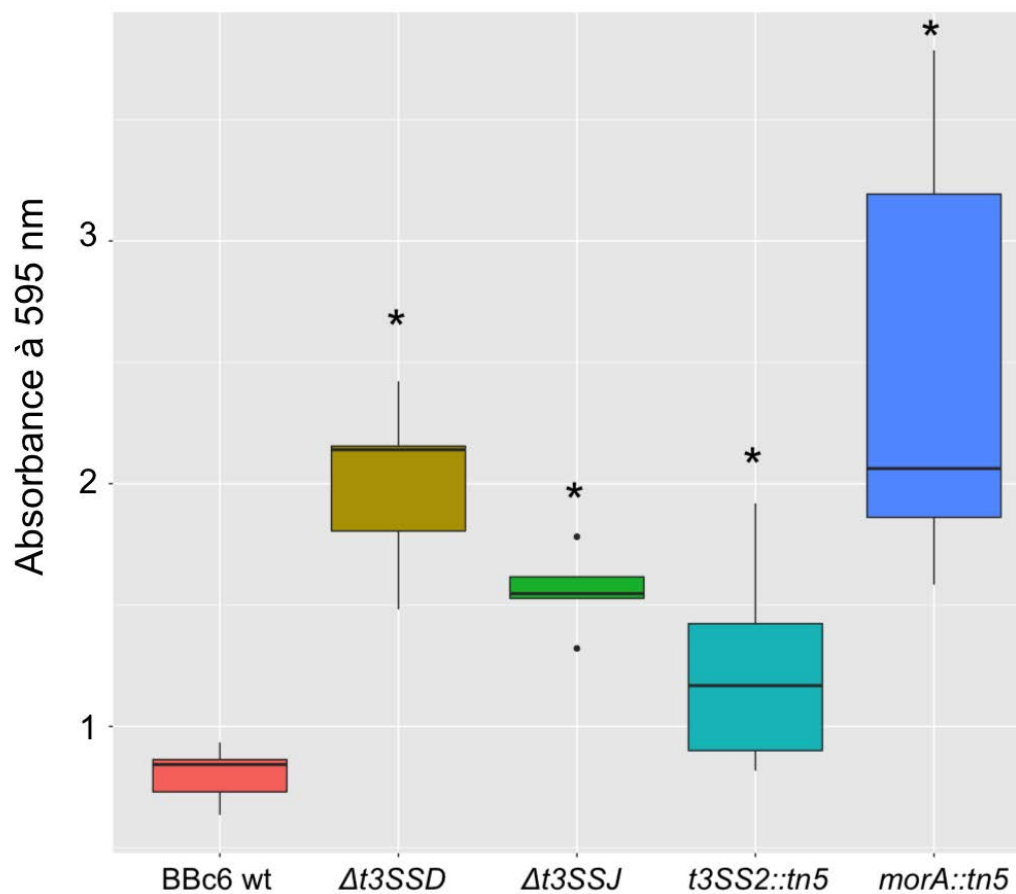


Figure 8.4 – Formation de biofilms sur surface abiotique par la souche BBc6R8 et certains de ses mutants.

La mesure de la densité optique à 595nm est proportionnelle à la quantité de cristal violet fixé. L'analyse a été réalisée sur 7 réplicats pour chaque souche. * : indique une différence significative avec la souche sauvage selon un test d'ANOVA ($p < 0.05$)

structure du biofilm, ce qui pourrait modifier la façon dont le biofilm interagit physiquement avec les hyphes et donc se répercuter sur l'interaction moléculaire entre les deux partenaires. En effet, la méthode de quantification par coloration au cristal violet utilisée ici ne permet que de quantifier les biofilms dans leur ensemble (matrice incluse). Le cristal violet se liant indifféremment à toutes les molécules chargées négativement (Li *et al.* 2003), il va se fixer non seulement aux membranes cellulaires, mais également à beaucoup de constituants de la matrice tels que des exo-polysaccharides ou l'ADN. Ainsi, les résultats obtenus pourraient résulter par exemple d'une surexpression d'un constituant matriciel chargé négativement et non d'une réelle augmentation de la densité cellulaire. Il sera donc nécessaire de vérifier la densité des biofilms formés par ces mutants par microscopie, ce dont il sera question dans la prochaine section (8.3). De plus, puisque les résultats présentés ici ont été obtenus sur une surface abiotique, il est possible qu'ils ne reflètent pas le réel effet de ces mutations sur la formation de biofilms sur les hyphes de *L. bicolor*. Pour cette raison l'analyse par microscopie présentée dans la prochaine section sera réalisée sur des biofilms formés sur des hyphes.

En ce qui concerne le T3SS, ce système est surtout connu pour être impliqué dans l'injection de protéines effectrices, qui sont souvent fortement impliquées dans l'interaction avec les cellules hôtes Eucaryotes (Coombes 2009). Il est donc envisageable que la perte de l'effet auxiliaire des mutants du T3SS soit davantage liée à une absence d'effecteurs plutôt qu'à une altération de leur formation de biofilm. Afin de vérifier cette piste une recherche d'effecteurs potentiels du T3SS de BBc6R8 a été réalisée par analyse bio-informatique de son génome³. Cette analyse a été effectuée en combinant la recherche de peptide signal via la plateforme en ligne EffectiveDB⁴, la détection d'un motif consensus présent dans les régions promotrices putatives d'effecteur du T3SS chez *P. fluorescens* Q8r1-96 (Mavrodi *et al.* 2011) et la recherche d'homologie avec une base de données d'effecteurs du T3SS identifiés chez d'autres bactéries (Wang *et al.* 2011). Ceci a permis d'identifier un gène candidat⁵ qui code une protéine dont la petite taille⁶ est cohérente avec une

3. No. accession AKXH02000000, (Deveau *et al.* 2014a)

4. <http://www.effectors.org/>

5. MHB_001808

6. 323 acides aminés

sécrétion. Un mutant de ce gène a été construit via une mutagenèse dirigée⁷ et devrait être testé pour son effet auxiliaire sur la mycorhization de *L. bicolor*, ce qui n'a pour l'instant pas pu se faire en raison de problèmes techniques. Ce mutant a par contre pu être testé pour sa formation de biofilms sur surface abiotique et n'a pas montré de phénotype particulier (données non montrées). Ce résultat n'est pas étonnant puisqu'il est peu probable que les effecteurs du T3SS interviennent dans l'interaction avec des surfaces abiotiques. Une prochaine étape pourrait donc être de tester la formation de biofilm de ce mutant sur les hyphes de *L. bicolor*. Enfin, si des résultats intéressants sont obtenus avec ce mutant, il conviendra de vérifier que le gène muté correspond bien à un effecteur du T3SS.

8.2.2 Analyse des biofilms formés sur les hyphes de *L. bicolor* par microscopie

L'analyse par la méthode de coloration au cristal violet des biofilms formés sur surfaces abiotiques par les mutants de BBc6R8 a révélé qu'ils étaient plus denses que ceux formés par la souche sauvage. Afin de vérifier cette information sur surface fongique une analyse des biofilms formés sur *L. bicolor* par les mutants de BBc6R8 a été réalisée par microscopie. Dans ce but, des versions GFP des mutants ont d'abord été créées via l'utilisation de plasmides intégratifs⁸. Les biofilms formés par les versions GFP de BBc6 et ses mutants, sur des colonies de *L. bicolor*, ont ensuite été analysés par microscopie confocale selon le même protocole que présenté précédemment (chapitre 4), avec 16 h d'interaction, en triplicats.

L'analyse par microscopie a montré une localisation des biofilms sur les colonies fongiques similaire entre les souches, puisque dans tous les cas les biofilms sont principalement situés en région apicale. En terme de densité, les biofilms formés par les mutants n'ont pas non plus montré de différences significatives avec la souche sauvage (fig. 8.5). Du moins, si elles existent, ces différences ne sont pas assez importantes pour pouvoir être jugées par une analyse qualitative. Ceci ne

7. Réalisée par un laboratoire privé

8. Le protocole de la construction des souches *-gfp* est donné en page 180.

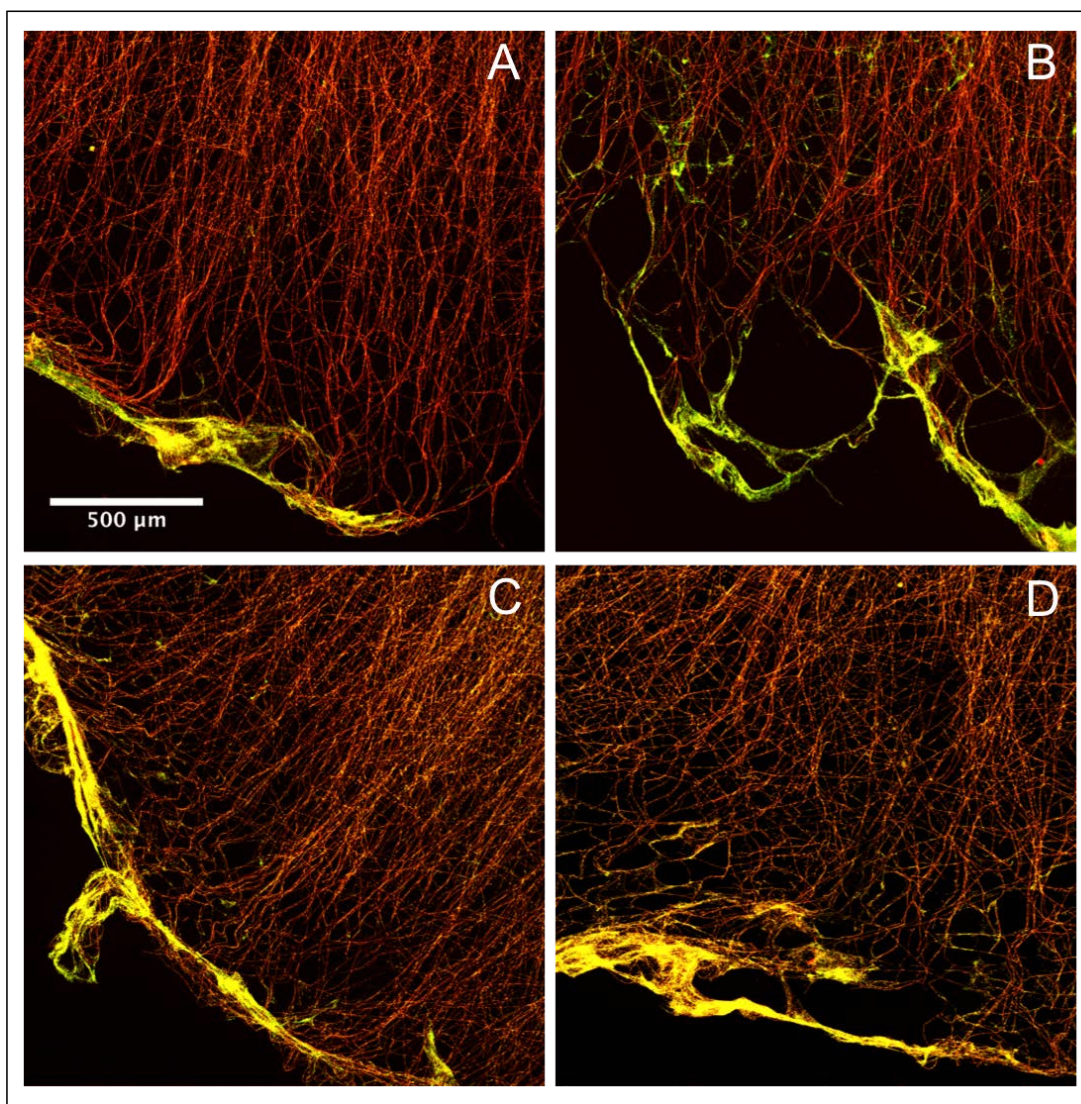


Figure 8.5 – Analyse par microscopie confocale des biofilms formés par BBc6 et ses mutants sur les hyphes de *L. bicolor*

Les biofilms ont été analysés après 16h d'interaction. Les images présentées ici ont été obtenues par projection 2D de coupes optiques obtenues par microscopie confocale au grossissement 40X. Les hyphes fongiques sont marqué au fun 1 (rouge). Les bactéries ont été modifiées pour produire de la GFP (vert) cependant, elles apparaissent ici en jaune car elles sont également marquées par le fun 1. A) BBc6 wt ; B) $\Delta t3ssj$; C) $t3ss2 :: tn5$; D) $morA :: tn5$.

nous permet donc pas de confirmer les résultats qui avaient été obtenus sur surface abiotique par la méthode du cristal violet, sans pour autant être en désaccord avec ces derniers. En effet, bien que significatives, les différences qui avaient été observées n'étaient pas grandes (un facteur 2 en moyenne, fig. 8.4). Il n'est donc pas surprenant qu'une analyse qualitative ne suffise pas à les révéler.

8.3 Conclusions et perspectives

Les biofilms formés sur surface abiotique par des mutants de BBc6R8 ayant perdu leur effet auxiliaire sont apparus plus denses que ceux formés par BBc6R8 via la méthode de marquage au cristal violet (fig. 8.4). Une analyse par microscopie, réalisée sur des biofilms formés cette fois-ci sur des hyphes, n'a par contre pas permis d'observer de différences significatives entre les mutants et la souche sauvage (fig. 8.5). Les différences de densité entre les souches sont probablement trop faibles pour être révélées par une analyse qualitative. Une analyse plus poussée va donc nécessiter de finaliser la mise au point d'une méthode quantitative applicable à des biofilms formés sur des hyphes (cf. Chapitre 5). De plus, concernant les mutants *t3ss2 :: tn5* et *morA :: tn5* la confirmation des résultats pour la formation de biofilms et aussi pour l'effet auxiliaire va nécessiter de vérifier que des versions complémentées des mutants présentent des phénotypes semblables à la souche sauvage. Enfin, même si les résultats concernant la formation de biofilms de ces mutants sur surface abiotique étaient confirmés sur surface fongique, cela ne permettrait pas pour autant de faire le lien entre la formation de biofilm de BBc6 et son effet auxiliaire. La mise en évidence d'un tel lien pourrait s'avérer délicate, car on cherche ici à trouver une corrélation entre deux processus complexes qui impliquent chacun de nombreuses voies de régulations. En effet, il a été montré que selon les espèces, 1 à 38 % des gènes totaux étaient régulés durant la formation de biofilms (Sauer 2003). Concernant l'effet auxiliaire, bien que les données transcriptomiques manquent, il est probable que cet effet implique de nombreux gènes. La probabilité que la mutation d'un gène influence à la fois l'effet auxiliaire et la formation de biofilms est donc assez élevée. Pour la mise en évidence d'une corrélation robuste il serait donc intéressant d'obtenir plusieurs mutants de BBc6 ne

formant plus de biofilms (via mutagénèse dirigée ou recherche dans la banque des mutants *tn5*), et de vérifier qu'ils sont bien tous affectés négativement dans leur effet auxiliaire. Enfin, alors que l'effet de BBc6 sur le transcriptome de *L. bicolor* commence à être bien documenté (Deveau *et al.* 2007; Labbé *et al.* 2014), peu de données concernent le transcriptome de BBc6 (Deveau *et al.* 2014b). Pourtant la comparaison des transcriptomes de BBc6 entre l'état planctonique, les biofilms sur les hyphes et les biofilms sur surface abiotique apporterait de nombreuses informations sur l'effet auxiliaire et la formation de biofilm de cette souche, ainsi que sur une éventuelle corrélation entre ces deux processus. Cette analyse semble donc être une prochaine étape indispensable à la compréhension des interactions physiques et moléculaires entre BBc6 et *L. bicolor*.

Quatrième partie

Pour conclure

Chapitre 9

Conclusion générale et perspectives

L'étude présentée ici a non seulement permis de satisfaire à l'objectif de cette thèse, à savoir la description de l'interaction physique entre l'ECM *L. bicolor* et la BAM BBc6, mais a aussi permis l'acquisition de connaissances plus générales concernant les biofilms bactériens, et non restreintes aux deux organismes de référence utilisés. Il sera question dans ce dernier chapitre de revenir sur les résultats principaux obtenus, les questions qu'ils soulèvent et les solutions proposées pour y répondre. Ces points sont également résumés dans le tableau 9.1 p.156.

9.1 Formation de biofilms par BBc6 sur les hyphes de *L. bicolor*

En amont de cette thèse il avait été reporté que la BAM BBc6 formait des structures ressemblant à des biofilms sur les hyphes de l'ECM *L. bicolor*, mais il était dans un premier temps nécessaire de confirmer que ces structures correspondaient à de « vrais biofilms ». En effet, un biofilm répond à des critères particuliers qui le différencient d'une simple adhésion. Ainsi, deux observations permettent maintenant de confirmer que les structures observées correspondent bien à des biofilms :

1. L'aspect cinétique de l'interaction physique entre BBc6 et *L. bicolor*, avec une étape précoce d'adhésion suivie d'une formation de colonies, puis d'une maturation aboutissant à une structure épaisse constituée de plusieurs couches de bactéries (fig. 4.3 p.53, 6.1 p.92 et 9.1).

Résultats	Questions amenées	Perspectives
Les biofilms sont localisés en région apicale des colonies fongiques dans un système bipartite et sont localisés aux environs des mycorhizes dans un système tripartite	Quels sont les facteurs intervenant dans ces localisations ?	Comparaison des propriétés physico-chimiques entre les hyphes de la zone apicale, de la zone centrale et ceux du manteau fongique au voisinage des mycorhizes (métabolome, protéome, pH, hydrophobicité)
Les matrices des biofilms de BBc6 et de l'ensemble des souches bactériennes testées sont constituées d'un squelette de filaments contenant de l'ADN	- L'ADN constituant les filaments est-il d'origine lytique ou provient-il d'une sécrétion ? - Quel est sa séquence ? - Quel est son rôle ? - Est-il associé à d'autres molécules ?	Développement d'une méthode de purification des filaments afin d'analyser leur composition et de séquencer l'ADN qu'ils contiennent
	Par quel mécanisme sont formés les filaments ?	Suivi de l'activité lytique dans les biofilms de BBc6
Des amas de glycoprotéines semblent présents dans la matrice des biofilms de BBc6	A quoi correspondent ces amas ?	- Utilisation de marqueurs fluorescents spécifiques d'autres composés souvent présents dans les matrices de biofilms (cellulose, lipides...)
	Quel sont les autres composés constituant la matrice ?	- Extraction de la matrice et analyse de sa constitution (protéomique et métabolomique)
La totalité des souches bactériennes testées a formé des biofilms sur les hyphes de <i>L. bicolor</i>	Qu'en est-il dans le cas d'une co-inoculation avec BBc6 ?	Analyse de la formation de biofilms par ces souches en confrontation avec BBc6 ainsi qu'en système tripartite
	Les biofilms de ces souches bactériennes seraient-ils également localisés au voisinage des mycorhizes dans un système tripartite ?	
Certaines espèces fongiques inhibent l'adhésion et/ou la formation de biofilms par BBc6 sur leurs hyphes	Quels facteurs sont impliqués dans ces inhibitions ?	Comparaison entre les propriétés physico-chimiques des hyphes des différents types de champignons (métabolome, protéome, pH, hydrophobicité)
	Quelle est la spécificité de cette inhibition ?	Test de la formation de biofilms par d'autres souches bactériennes sur les champignons inhibant celle de BBc6
<i>L. bicolor</i> et BBc6 ont un effet mutuel positif sur leur croissance qui ne nécessite pas de contact, mais dans certaines conditions BBc6 peut également exercer une forte compétition et inhiber la croissance de <i>L. bicolor</i>	Outre le tréhalose produit par le champignon et la thiamine produite par la bactérie (deveau et al., 2010), quel sont les autres facteurs impliqués dans ces interactions trophiques ?	Analyse transcriptomique par RNAseq réalisée sur les ARN fongiques et bactériens pendant leur interaction, couplée à l'analyse des métabolomes
Des mutants de BBc6 ayant perdu leur effet auxiliaire ont une formation de biofilms sur surface abiotique modifiée	Qu'en est-il sur surface fongique ?	Mise au point de méthodes d'analyse quantitative sur surfaces biotiques
	Un lien existe-t-il entre biofilm et effet auxiliaire ?	Obtention de mutants de BBc6 ne formant pas de biofilms et test de leur effet auxiliaire Etude détaillée de la formation de biofilms de BBc6 dans des systèmes tripartites et dans des systèmes en sol

Table 9.1 – Résumé des résultats principaux obtenus lors de cette étude, ainsi que les questions qui en découlent et les solutions proposées pour y répondre

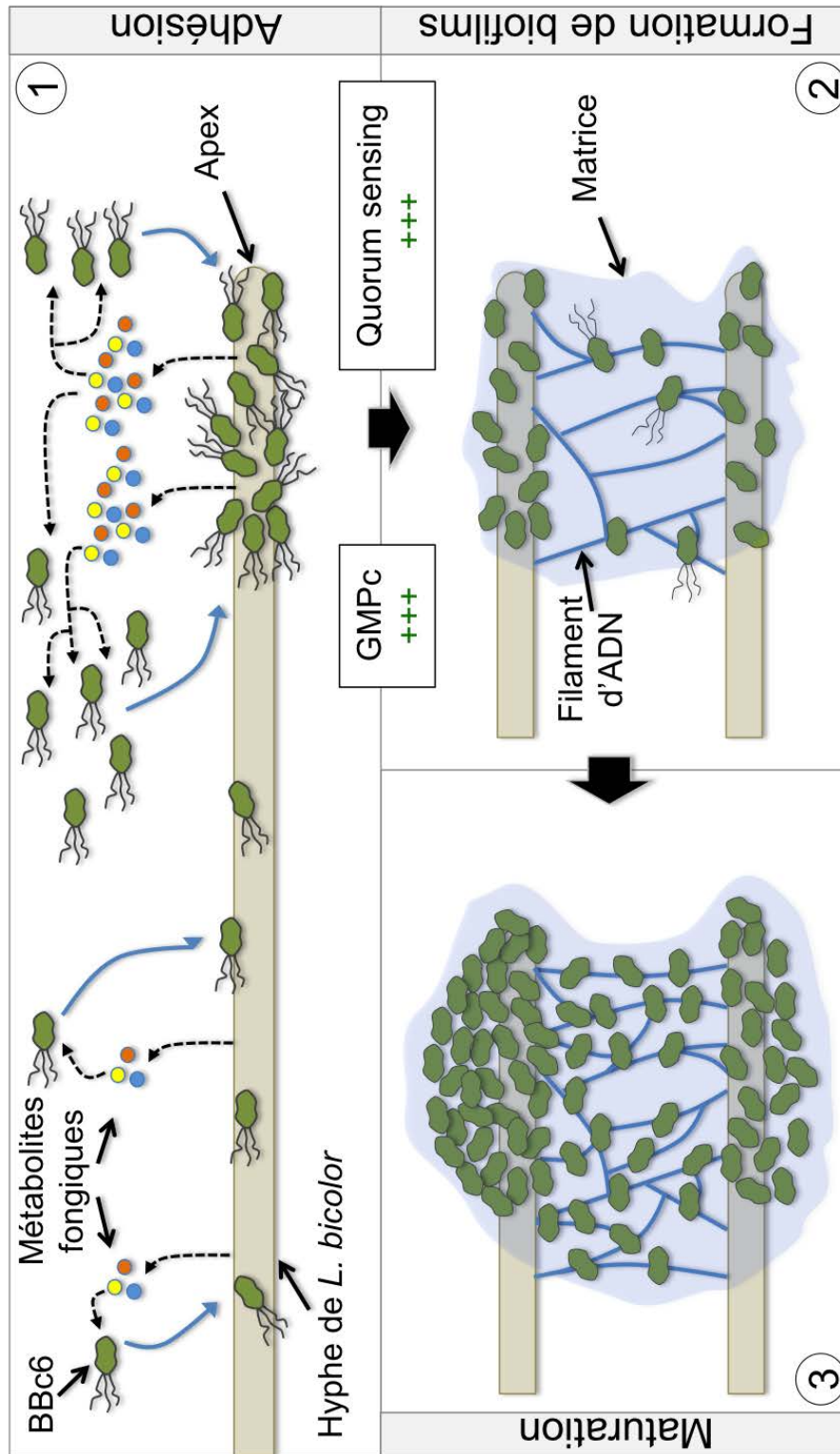


Figure 9.1 – Modèle théorique de la dynamique de la formation de biofilms par BBC6 sur les hyphes de *L. bicolor*

1) Adhésion : des métabolites produits par *L. bicolor* permettent le chimiotactisme des bactéries et leur adhésion sur les hyphes. En région apicale de la colonie fongique, qui est une zone de sécrétion active, une quantité importante des métabolites d'intérêt est libérée, ce qui va induire une densité bactérienne plus élevée sur les hyphes de cette région. 2) Formation de biofilms : dans les zones où la densité bactérienne est élevée, les expressions des gènes régulés par le "quorum sensing" et le di-GMPc sont modifiées ce qui induit la transition entre l'état mobile et l'état sessile des bactéries. Ainsi les bactéries perdent leurs flagelles et commencent la synthèse d'une matrice contenant entre autres des filaments d'ADN et des glycoprotéines. 3) Maturation : via des processus d'aggrégation et/ou de croissance bactérienne les biofilms formés vont croître aboutissant à des biofilms épais constitués de nombreuses couches de cellules.

2. La présence d'une matrice extra-cellulaire dans laquelle les cellules sont insérées (fig. 6.2 p.93).

L'analyse de l'interaction physique entre BBc6 et *L. bicolor* a permis de concevoir un modèle théorique de sa dynamique qui est représenté en figure 9.1. Selon ce modèle l'étape d'adhésion se réalise sur l'ensemble de la colonie fongique, les bactéries étant attirées par un ou des composé(s) sécrété(s) par *L. bicolor* ayant un intérêt trophique (eg. acide organiques ou sucres). Une densité de bactéries plus importante adhère en zone apicale de la colonie fongique, cette zone sécrétant une quantité plus élevée du ou des composé(s) d'intérêt. Une densité bactérienne locale élevée va ainsi activer la transcription des gènes contrôlés par le « quorum sensing » et activer la synthèse de di-GMP¹, conduisant ainsi à la transition entre l'état mobile et l'état sessile des bactéries. Les bactéries perdent alors leurs flagelles et commencent à synthétiser une matrice extra-cellulaire contenant des filaments d'ADN, des amas de glyco-proteines et certainement d'autres composés qui n'ont pas encore été détectés. Une fois la formation de biofilms amorcée, des processus de maturation via des phénomènes de croissance et d'agrégation² qui aboutissent à l'obtention de biofilms épais localisés dans la zone apicale des hyphes.

Certains aspects de ce modèle relèvent de choix réalisés entre plusieurs hypothèses. Ainsi, il est possible qu'en réalité l'adhésion sur l'ensemble de la colonie fongique ne soit pas due à la sécrétion d'un composé par *L. bicolor*. En effet, puisque BBc6 a également adhéré et formé des biofilms sur toutes les surfaces abiotiques testées lors de cette étude, il est possible que l'étape d'adhésion sur la colonie fongique ne nécessite aucunement la présence de composés attractifs. Puisque de nombreux avantages sont conférés par le mode de vie en biofilm, sans nécessité d'un bénéfice apporté par la surface elle-même, le simple fait de constituer une surface pourrait être suffisant pour motiver BBc6 à adhérer et former un biofilm sur la colonie fongique. Cependant, si l'étape d'adhésion pourrait être similaire à celle observée sur surfaces abiotiques, ce n'est pas le cas en ce qui concerne la formation des biofilms à proprement parler. La localisation préférentielle des biofilms sur une zone particulière de la colonie fongique indique en effet

1. Entre autre via l'induction de l'activité diguanylate cyclase de la protéine MorA

2. L'agrégation pourrait être facilitée par le caractère adhérent de la matrice et notamment des filaments d'ADN qu'elle contient

que celle-ci ne constitue pas qu'une simple surface pour BBc6. Cette localisation préférentielle pourrait être due à la présence d'un ou de composé(s) d'intérêt, sécrété(s)³ en quantité supérieure dans cette zone par rapport au reste de la colonie fongique, tel que représenté dans le modèle (fig. 9.1). Mais ici encore d'autres hypothèses sont à envisager. Le ou les composés pourrai(en)t par exemple n'être sécrété(s) que dans la zone apicale, et ils pourrai(en)t ne pas constituer un intérêt direct pour BBc6 mais plutôt contribuer à la modification des paramètres physico-chimiques locaux, aboutissant à des conditions plus favorables à la formation de biofilms. Par exemple, une modification locale du pH pourrait altérer ce processus, d'autant plus que des résultats préliminaires semblent indiquer qu'un pH basique favorise la formation de biofilm de BBc6 par rapport à un pH acide⁴. Il est également possible que cette localisation des biofilms soit liée aux propriétés de surface des hyphes qui peuvent varier au sein de la colonie fongique (eg. hydrophobicité). Enfin, une dernière hypothèse particulièrement attractive permet de corroborer plusieurs résultats de cette étude avec un résultats obtenu par Deveau *et al.* (2014b) montrant une surexpression du gène codant la protéine Tectonine 2 chez *L. bicolor* lors de son interaction avec BBc6 ou *P. fluorescens* Pf29A. Or, cette protéine de la famille des lectines, qui est localisée au niveau de la paroi fongique, est impliquée dans la reconnaissance et la fixation des lipopolysaccharides des membranes bactériennes. Il a de plus été montré que la Tectonine 2 de *L. bicolor* se lie aux membranes des bactéries à Gram négatif et provoque leur agrégation (Wohlschlager *et al.* 2014). On peut donc faire l'hypothèse que la Tectonine 2 soit responsable de la localisation des biofilms de BBc6 en étant principalement produite dans la zone apicale. De plus, fait on ne peut plus intéressant, il se trouve que les Tectonines sont très répandues chez les champignons basidiomycètes mais n'ont par contre jamais été reportées chez des ascomycètes (Wohlschlager *et al.* 2014). Le fait que *L. bicolor* surexprime la Tectonine 2 en présence de certaines bactéries pourrait alors suggérer un mécanisme actif de la part du champignon pour favoriser la colonisation bactériennes de ses hyphes. Il serait dans ce cas plus que probable que le champignon gagne un avantage à cette colonisation. Ceci serait envisageable puisque certaines études ont déjà montré des

3. ou libéré(s) passivement

4. Données non montrées

cas de colonisation bactérienne d'hyphes fongiques s'inscrivant dans une relation mutualiste. C'est par exemple le cas de la relation entre *Morchella crassipes* et *Pseudomonas putida*, dans laquelle le champignon semble "cultiver" la bactérie sur ses hyphes. *P. putida* bénéficie ainsi des exsudats fongiques pour sa nutrition et des hyphes en tant que support pour son développement et son transport, tandis que *M. crassipes* bénéficie d'une source de nutriments via la prédation des bactéries et acquiert également une meilleure résistance au stress environnementaux (Pion *et al.* 2013a). Il a de plus été montré que la formation de biofilms par certaines bactéries sur des mycorhizes formées par les ECM *Suillus tomentosus* et *Pisolithus tinctorius* avec le pin rouge⁵ permettait d'améliorer la dissolution des minéraux réalisée par ces ECM et de diminuer la dénudation chimique de la mycorhizosphère (Balogh-Brunstad *et al.* 2008). Enfin, le positionnement des biofilms de BBc6 en région apicale des colonies fongiques pourrait avoir un intérêt stratégique pour BBc6 en ce qui concerne son transport, puisque dans cette région des colonies fongiques la croissance des hyphes pourrait permettre un déplacement passif des bactéries (Nazir *et al.* 2010).

Beaucoup d'aspects restent donc à élucider concernant la localisation des biofilms sur les colonies fongiques. D'autant plus que, lorsque la plante est présente dans le système étudié (système tripartite), les biofilms formés par BBc6 sont alors localisés sur les hyphes aux environs des mycorhizes, et non sur la zone apicale des colonies fongiques. Afin de percer les mystères entourant ces localisations, il serait donc intéressant de réaliser des analyses pour comparer les propriétés physico-chimiques⁶ des hyphes entre la zone centrale et la zone apicale des colonies fongiques, ainsi que des hyphes constituant le manteau à proximité des mycorhizes. Une autre approche intéressante serait de poursuivre les tests réalisés avec des colonies fongiques préalablement tuées afin d'empêcher toute sécrétion active. Toutefois, il est dans ce cas nécessaire de trouver en amont une méthode pour tuer le champignon qui n'altère pas la structure des hyphes. Enfin, l'implication des voies de régulation du « quorum sensing » et du di-GMPc dans la formation de biofilms par BBc6, présenté dans le modèle, sera à vérifier. Dans

5. *Pinus resinosa*

6. Concentration en métabolites et protéines, pH, hydrophobicité...

un premiers temps il serait pour cela nécessaire de s'assurer de la présence d'un système de « quorum sensing » chez BBc6 et d'identifier les molécules impliquées.

9.2 Spécificité de l'interaction physique

L'interaction physique entre BBc6 et *L. bicolor* n'est pas spécifique puisque l'ensemble des souches bactériennes testées dans cette étude a formé des biofilms sur les hyphes de l'ECM (fig. 6.4 p.162). Cependant, il est important de noter que ces analyses ont uniquement été réalisées en testant individuellement chacune des souches bactériennes. Ainsi, bien que non spécifique, il reste possible que l'interaction entre BBc6 et *L. bicolor* soit tout de même favorisée dans un système confrontant plusieurs souches bactériennes. De plus, hormis BBc6, les autres souches bactériennes n'ont été testées qu'en interaction bipartite (sans la plante), il reste donc envisageable que l'interaction physique entre BBc6 et *L. bicolor* soit spécifique au niveau des mycorhizes dans un système tripartite. Il sera donc nécessaire d'éclaircir ces aspects. Alors que BBc6 a pu former des biofilms sur la majorité des espèces fongique testées, certaines espèces fongiques semblent cependant inhiber la formation de biofilms et/ou l'adhésion sur leurs hyphes (fig. 6.4 p.162). On peut ainsi distinguer 3 types d'interactions physiques entre BBc6 et les espèces fongiques testées (fig. 9.2). Tout d'abord il y a les espèces fongiques qui, comme *L. bicolor*, permettent l'adhésion et la formation de biofilms par BBc6, cela concerne la totalité des Basidiomycètes testés ainsi que deux Ascomycètes sur les six testés. Un second type d'interaction a été observé avec les espèces d'Ascomycètes appartenant aux *Aspergillaceae* (*A. ustus* et *P. funiculosus*), pour lesquels de l'adhésion a été observée mais sans formation de biofilms⁷. Il semble donc que chez ces champignons un ou des facteur(s) inhibe(nt) la formation de biofilms de BBc6. Certaines des hypothèses concernant ces facteurs sont représentées sur la figure 9.2. On peut ainsi spéculer que des facteurs similaires à ceux évoqués concernant la localisation des biofilms en région apicale de *L. bicolor*, à savoir le pH et l'hydrophobicité, seraient ici défavorables à la formation de biofilms. En effet, ces paramètres peuvent par exemple influencer les propriétés adhésives de

7. Pas de matrice visible et une seule couche de cellules sur les hyphes

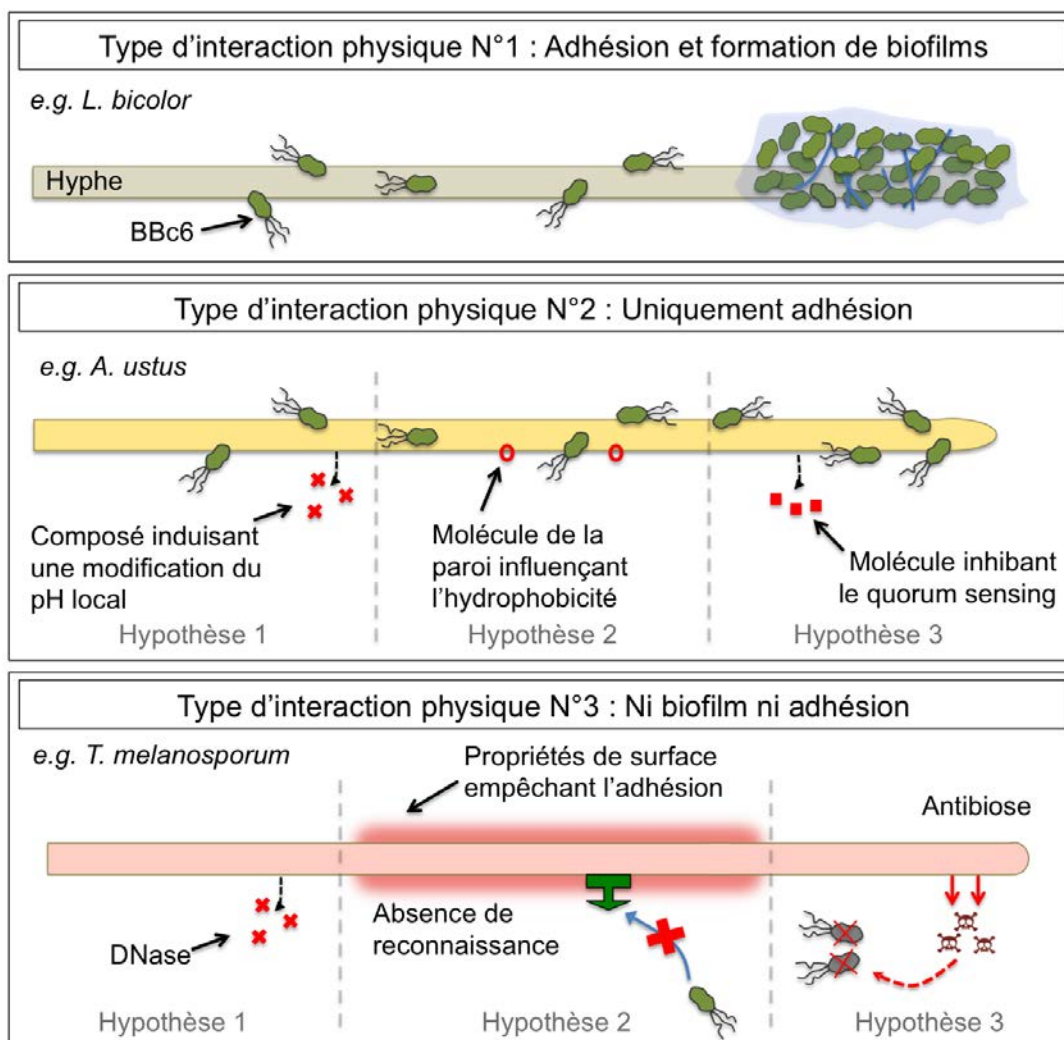


Figure 9.2 – Différents types d'interactions physiques observés entre BBc6 et les espèces fongiques testées.

Différentes hypothèses concernant les facteurs impliqués dans l'inhibition de la formation de biofilms et de l'adhésion, respectivement dans les interactions de types 2 et 3, sont également représentées.

la molécule d'ADN (Benke *et al.* 2011) et ainsi empêcher la formation d'une matrice. Une autre hypothèse intéressante serait la production de molécules inhibant le « quorum sensing » bactérien. Il a par exemple été montré que *Penicillium radicicola* et *Penicillium coprobium* produisent respectivement de l'acide penicillique et de la patuline, molécules inhibant le "quorum sensing" chez *P. aeruginosa* (Rasmussen *et al.* 2005). Une inhibition du "quorum sensing" bactérien a également été récemment montrée chez le champignon saprophyte *Coprinus comatus* (De Carvalho *et al.* 2016) ainsi que chez des champignons mycorhiziens (Uroz et Heinonsalo 2008). Toutefois avant d'explorer cette hypothèse, il serait nécessaire en amont d'identifier les composants du « quorum sensing » chez BBc6. Enfin, un troisième type d'interaction a été observé chez les Ascomycètes du genre *Tuber*, pour lesquels l'interaction physique est inhibée dès l'étape d'adhésion. Trois hypothèses concernant cette inhibition sont représentées sur la figure 9.2. Tout d'abord, il a été montré que l'ADNe était indispensable à l'adhésion de BBc6 sur surface abiotique (cf. p.101). Une hypothèse à envisager serait donc que ces champignons produisent de la DNase. Une autre possibilité serait l'existence de mécanisme de sélection, par la nécessité de reconnaissance de cible spécifique. Ainsi, il se peut que les propriétés physico-chimiques des hyphes de ces *Tuber* empêchent l'adhésion bactérienne, mais qu'en revanche l'adhésion spécifique de certaines souches bactérienne puisse avoir lieu au niveau de cibles particulières accessibles sur la paroi fongique, comme cela semble être le cas chez *T. borchii* (Cerigini *et al.* 2008). Enfin, il est également possible que ces champignons produisent un antibiotique auquel BBc6 est sensible. Dans ce cas l'absence d'adhésion bactérienne serait en fait due à la mort des bactéries.

Afin d'identifier les facteurs intervenant dans l'inhibition de la formation de biofilms et de l'adhésion, une analyse des propriétés physico-chimiques des hyphes de ces champignons serait ici aussi particulièrement intéressante. De plus afin de connaître la spécificité des mécanismes d'inhibition il serait nécessaire de tester la formation de biofilms sur ces champignons par d'autres espèces bactériennes. Enfin, afin de vérifier l'hypothèse de l'antibiose dans le cas des champignon du genre *Tuber*, il serait nécessaire de vérifier la vitalité des cellules bactériennes planctoniques après leur interaction avec ces champignons.

9.3 Interactions trophiques entre BBc6 et *L. bicolor*

Si il n'est pour l'instant pas possible d'affirmer que des composés d'intérêt trophique sécrétés par *L. bicolor* sont responsables de la localisation des biofilms de BBc6, il est en revanche certain que ces deux organismes ont une interaction trophique *in vitro* sur un milieu solide. En effet, il avait déjà été montré en amont de cette thèse que dans ces conditions BBc6R8⁸ avait un effet positif sur la croissance radiale du champignon, et l'on sait maintenant, compte tenu des résultats présentés en 7.2, p.126, que cet effet est réciproque. L'existence d'une telle interaction a de plus été confirmée par des résultats transcriptomiques montrant une modulation des gènes impliqués dans le métabolisme primaire et le transport de nutriments chez l'ECM et la BAM pendant leur interaction *in vitro* (Deveau *et al.* 2014b).

Ces effets positifs réciproques ne nécessitent pas de contact entre ces deux organismes, et seraient donc dus à des composés sécrétés ou libérés passivement. Deux composés potentiellement impliqués dans ces effets, ont à ce jour été identifiés⁹, mais d'autres interviennent certainement et nécessiteront d'autres études afin d'être identifiés. Paradoxalement, selon les conditions, BBc6 peut également avoir un effet négatif sur la croissance de *L. bicolor*, probablement en raison de phénomènes de compétition (fig. 7.3 p.129; Brulé *et al.* (2001) et Deveau *et al.* (2016a)). De plus, il est possible que l'effet positif de la BAM observé sur la croissance radiale de l'ECM résulte lui aussi de phénomènes de compétition. En effet, une croissance radiale supérieure n'implique pas pour autant une biomasse fongique augmentée. Il est possible qu'un appauvrissement en nutriments, résultant d'une compétition exercée par BBc6, force l'ECM à parcourir une distance plus importante pour atteindre ces derniers. Dans ce cas la croissance radiale serait effectivement augmentée mais au dépend du développement en épaisseur. C'est d'ailleurs ce principe qui est utilisé pour obtenir des colonies fongiques fines dans la méthode exposée au chapitre 4, via l'utilisation d'un milieu peu concentré en

8. La souche BBc6R8 correspond à un mutant spontané résistant à la rifampicine de la souche d'origine BBc6

9. Tréhalose produit par *L. bicolor* et thiamine produite par BBc6 (Deveau *et al.* 2010).

source de carbone. De plus, un tel phénomène a déjà été observé en ce qui concerne l'interaction entre la BAM *Streptomyces* AcH 505 et l'ECM *Amanita muscaria*, puisque cette BAM a effectivement un effet positif sur la croissance radiale de l'ECM mais associé à une diminution importante de sa biomasse (Schrey *et al.* 2007). Il est alors envisageable que l'effet auxiliaire de BBc6 résulte en réalité d'un effet de compétition, forçant le champignon à se développer sur de longues distance pour chercher des éléments nutritifs dans le sol, augmentant ainsi ses probabilités de rencontre avec les racines des arbres.

Afin de décrire cette relation trophique de façon plus fine, il serait intéressant de suivre les transferts de carbone entre BBc6 et *L. bicolor* via des marquages isotopiques¹⁰. De plus, il serait intéressant d'effectuer une nouvelle analyse transcriptomique mais cette fois-ci en utilisant la technologie de séquençage ARN (RNAseq) qui est bien plus sensible que la technologie de « micro-array » utilisée jusque là (Deveau *et al.* 2014b).

10. e.g (Pion *et al.* 2013a)

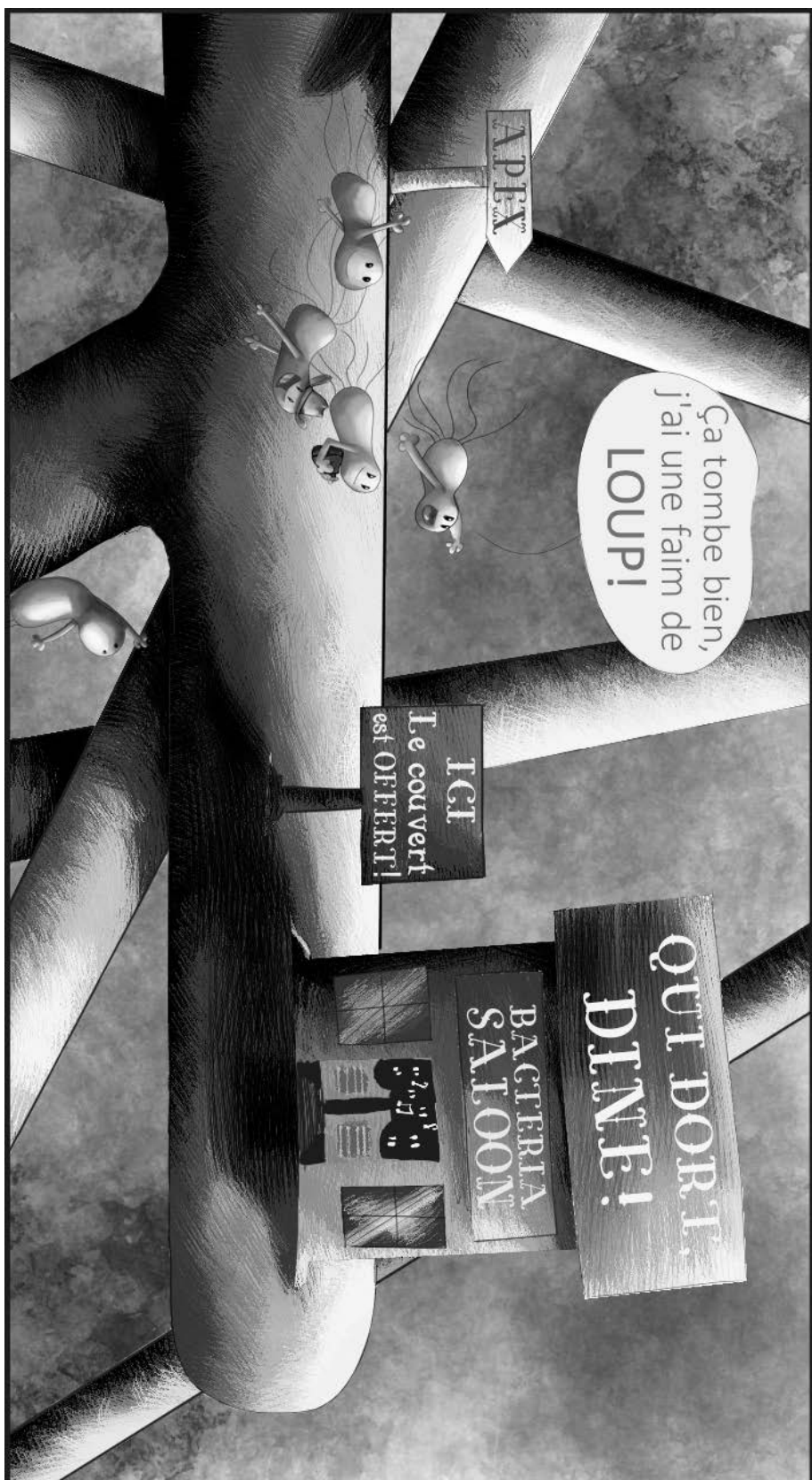


Figure 9.3 – Il peut être préférable qu'avec le gîte soit fourni le couvert!
 La localisation des biofilms de BBc6 sur les colonies de *L. bicolor* pourrait être en lien avec un facteur trophique. Dessin réalisé par un ami anonyme.

9.4 Les filaments d'ADN

L'analyse de la matrice des biofilms de BBc6 a permis de découvrir qu'un réseau de filaments composés d'ADN en constitue le squelette (fig. 6.5 p.100). Alors que ce type de structures en ADN n'a jusqu'alors que peu été reporté dans la littérature, il a été observé dans les biofilms de l'ensemble des souches bactériennes testées dans cette étude. De plus la production de structures similaires en ADN a été reportée chez des cellules animales, végétales ou encore chez des amibes, ce qui montre l'universalité du phénomène (De Buhr et Köckritz-blickwede 2016 ; Driouich *et al.* 2013 ; Minh Tran *et al.* 2016 ; Zhang *et al.* 2016). Il semble donc que l'ADN, jusque là principalement cantonné à son rôle en tant que support de l'information génétique, ait d'autres fonctions qui bien que très répandues, nous ont jusque là échappé. Ceci nous montre que même sur un sujet aussi étudié que la molécule d'ADN, il nous reste toujours beaucoup à découvrir. Cette découverte ouvre maintenant de nombreuses questions et hypothèses. On peut ainsi se demander si cet ADN provient de la lyse ou bien d'une sécrétion, si il correspond à l'ADN génomique total ou bien à une séquence spécifique, et si il est associé à d'autres molécules. De plus, puisqu'il n'est pas d'ordre génétique, quel est le rôle de cet ADN ? Enfin, en raison de la longueur conséquente des filaments¹¹, leurs mécanismes de formation sont également intrigants. Il est peu probable que les bactéries puissent « tirer » ces fils sur des distances aussi longues, des processus physico-chimiques seraient donc peut être davantage envisageables. Toutefois, l'aspect « dirigé » de l'orientation des filaments, tendus entre deux hyphes ou deux fibres de verre (fig. 6.15 p.123), donne l'impression d'un mécanisme actif.

Afin de répondre à ces questions, une première étape serait de parvenir à isoler ces filaments. Cela permettrait d'en analyser la composition, ainsi que la séquence de l'ADN les constituant, ce qui pourrait fournir des informations quant à leur rôle et leur origine. Le suivi de l'activité lytique au sein des biofilms de BBc6 pourrait quant à lui vérifier l'hypothèse d'une origine lytique de cet ADN. Concernant les mécanismes de formation des filaments, il pourrait être intéressant de puiser des idées dans les processus industriels utilisés pour la synthèse de nano-structures

11. Mesurant jusqu'à plusieurs centaines de μm , fig. 6.15 p.123

en ADN (Yonggang et Pengfei 2017). Cela pourrait permettre de savoir si il est envisageable que les réseaux de filaments observés dans les biofilms de BBc6 soient uniquement formés par des réactions physico-chimiques. Des méthodes permettent par exemple la fixation de longs doubles brins d'ADN sur des surfaces solides, via des mécanismes dépendant du pH du milieu et de l'hydrophobicité de la surface (Benke *et al.* 2011). Enfin, une solution pour élucider les mécanismes de formation des filaments serait de parvenir à observer ce processus en temps réel, via par exemple l'utilisation de puce de microfluidique et de marqueur de l'ADN n'altérant pas la viabilité cellulaire.

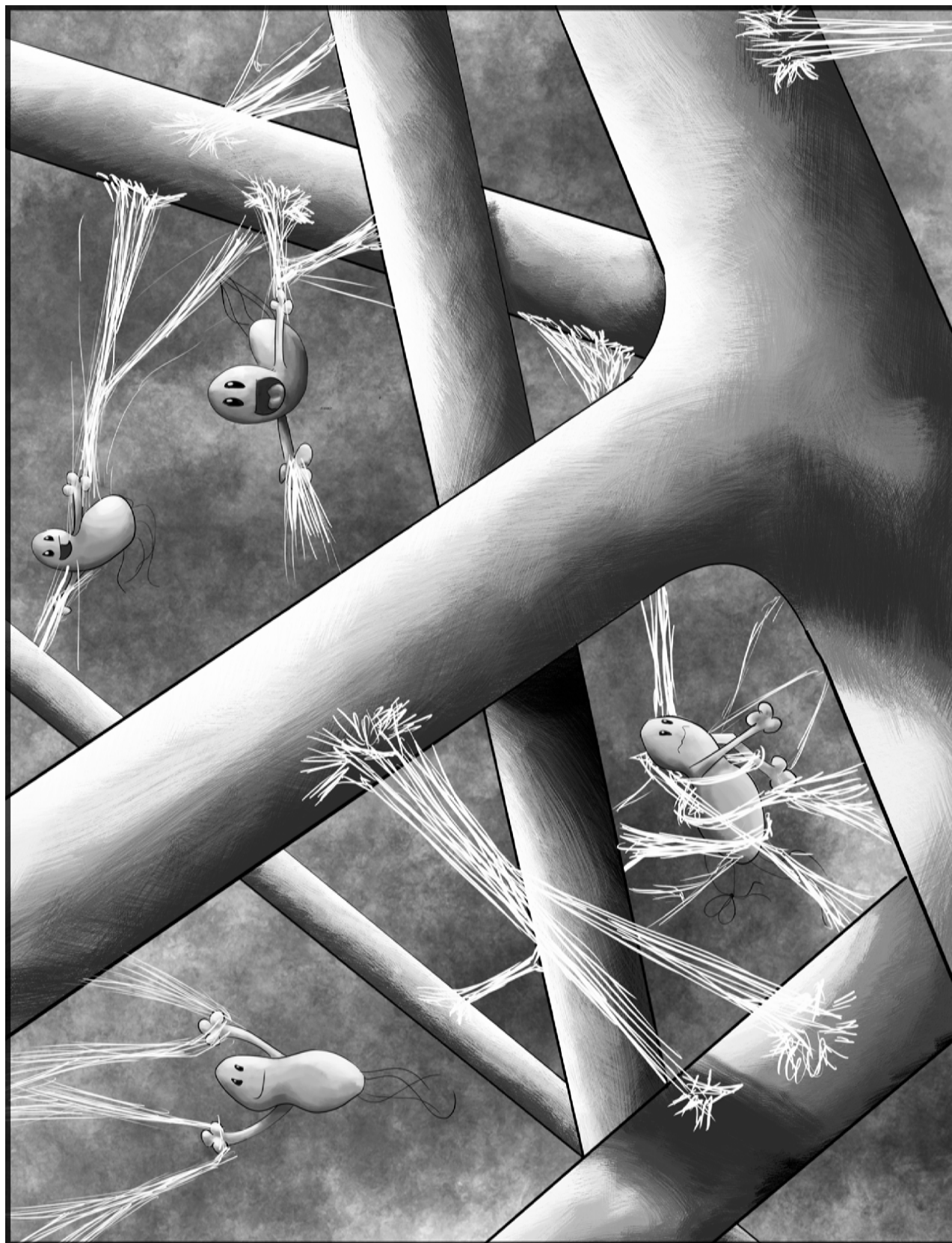


Figure 9.4 – Spider bacteria.

Les biofilms de BBc6 sont structurés par des filaments d'origine bactérienne contenant de l'ADN qui relient les hyphes fongiques ainsi que les cellules. Dessin réalisé par un ami anonyme.

9.5 Existe-t-il un lien entre l'effet auxiliaire de BBc6 et sa formation de biofilms ?

Un effet positif de bactéries sur la croissance radiale de certains ECM a fréquemment été reporté (Founoune *et al.* 2002 ; Riedlinger *et al.* 2006 ; Deveau *et al.* 2007 ; Labbé *et al.* 2014). Cet effet est donc suspecté d'être un facteur majeur dans l'effet auxiliaire, une croissance radiale augmentée induisant une augmentation de la probabilité de rencontre entre les ECM et les racines des arbres. Puisque qu'il a été montré que l'effet de BBc6R8¹² sur la croissance radiale de *L. bicolor* ne nécessite pas de contact (7 p.126), il peut dans ce cas sembler improbable que l'effet auxiliaire de cette souche nécessite la formation d'un biofilm. Cependant, il se trouve que les mutants ayant perdu leur effet auxiliaire utilisés dans cette étude, ont par contre conservé leur effet sur la croissance radiale de l'ECM (données non montrées). L'effet sur la croissance radiale de l'ECM n'est donc pas le seul facteur intervenant dans l'effet auxiliaire de cette BAM, la possibilité d'une nécessité de contact entre les deux organismes n'est donc pas écartée. De façon intéressante des mutants de BBc6R8 ayant perdu leur effet auxiliaire se sont avérés avoir une formation de biofilm altérée sur milieu abiotique (fig. 8.4 p.146). Cependant, cela ne suffit pas à confirmer un lien entre formation de biofilms et effet auxiliaire. De plus, il est important de garder à l'esprit que l'effet auxiliaire de BBc6 pourrait aussi être en lien avec son interaction avec la plante, et il a d'ailleurs déjà été montré que cette bactérie est également une PGPR¹³ (Gamalero *et al.* 2003 ; Labbé *et al.* 2014). De plus, lorsque la plante est présente, les biofilms formés par cette BAM sont alors localisés sur les hyphes qui sont dans la proximité des racines (fig. 6.3 p.95). Aussi, le lien entre l'effet auxiliaire de BBc6 et sa formation de biofilm pourrait plutôt se situer au niveau de son interaction avec la plante. Ainsi, on peut par exemple spéculer que si dans les sols les biofilms de BBc6 sont situés près des racines des arbres, les filaments d'ADN contenus dans la matrice pourraient constituer pour la plante une ressource d'azote et de phosphore, éléments limitants dans le sol.

12. La souche BBc6R8 correspond à un mutant spontané résistant à la rifampicine de la souche d'origine BBc6

13. Plant Growth Promoting Rhizobacteria

Afin de vérifier l'existence d'un lien entre l'effet auxiliaire de BBc6 et sa formation de biofilms sur les hyphes de *L. bicolor*, il serait nécessaire de vérifier les résultats obtenus pour la formation de biofilms de ces mutants sur surface abiotique sur surface fongique. Cependant, les essais de quantification de biofilms sur des colonies fongiques, réalisés durant cette étude, nécessitent des ajustements. Il serait donc intéressant dans un premier temps d'obtenir des mutants de BBc6 ne formant pas de biofilms et de les tester pour leur effet auxiliaire. Enfin, la compréhension fine de l'effet auxiliaire nécessite d'être dans des conditions permettant à cet effet d'exister, il semble donc indispensable d'inclure la plante dans les systèmes étudiés.



Figure 9.5 – BAM service : effet auxiliaire en échange d’une surface.

L’effet auxiliaire de la BAM BBc6 pourrait être en lien avec sa formation de biofilms sur les hyphes de l’ECM *L. bicolor*. Dessin réalisé par un ami anonyme.

9.6 Nécessité des études en sol

La complexité structurale, chimique et biologique des écosystèmes des sols rendent leur étude *in situ* particulièrement délicate. Ainsi des approches *in vitro* permettant de simplifier les systèmes étudiés et d'en contrôler les paramètres s'avèrent particulièrement utiles. Toutefois, de telles approches amènent à une vision restreinte des systèmes étudiés. En conséquence, bien que les résultats obtenus dans l'étude présentée ici permettent d'approfondir les connaissances sur les interactions entre les champignons et les bactéries du sol dans des conditions *in vitro*, il reste difficile de les extrapoler à un écosystème naturel. Tout d'abord, comme l'on a pu le voir les interactions entre micro-organismes reposent sur un équilibre fragile. Ainsi, il suffit d'une faible concentration en fer (Deveau *et al.* 2016a) ou d'une trop forte densité bactérienne (fig. 7.3 p.129) pour que l'effet de BBc6R8 sur la croissance radiale de *L. bicolor* passe d'un effet positif à une inhibition totale. Dans un écosystème naturel, les paramètres physico-chimiques du sol pourraient donc grandement influencer l'interaction entre BBc6 et *L. bicolor*. De plus, dans un tel système, de nombreuses espèces végétales, bactériennes, fongiques mais aussi animales vont interagir aux travers de multiples types d'interactions allant de la symbiose à la prédation en passant par le parasitisme. Ceci est d'ailleurs particulièrement vrai dans les biofilms naturels des sols qui sont composés d'une multitude d'organismes d'espèces variées (Burmølle *et al.* 2012). Dans un sol, l'interaction entre deux organismes sera donc également fortement influencée par les autres organismes présents dans leur proximité. Il semble donc indispensable de vérifier les résultats de cette étude dans des systèmes d'interactions faisant intervenir plusieurs espèces bactériennes et/ou fongiques, et également dans des systèmes se rapprochant au maximum d'un sol naturel.

Au vu du contexte écologique actuel, l'importance d'étudier les interactions entre les micro-organismes du sol ne fait aucun doute. En effet, le sol constitue à la fois un puits et une source de dioxyde de carbone (CO₂) atmosphérique très importante. Alors que la capture du CO₂ par les sols est principalement liée à l'activité des végétaux, la libération de CO₂ est quant à elle majoritairement liée à l'activité des micro-organismes (Gougoulas *et al.* 2014). Il est d'ailleurs estimé que la quantité de CO₂ relâché dans l'atmosphère par les micro-organismes du

sol est dix fois supérieure à celle provenant de l'utilisation des énergies fossiles. Cependant, les micro-organismes participent également à la séquestration du carbone dans le sol via la formation de matière organique récalcitrante. Le ratio entre le taux de relargage de CO_2 et son taux de séquestration par les sols pourrait être sous l'influence des interactions existant entre les micro-organismes du sol, qui vont réguler leurs abondances et la composition de leurs communautés et donc leurs activités. Il a par exemple été montré qu'une abondance relative élevée entre les champignons et bactéries du sol permet un taux de séquestration du carbone supérieur (Six *et al.* 2006). Si à ce jour la capture du CO_2 atmosphérique par le sol est supérieure à sa production, l'équilibre entre ces processus contraires est cependant fragile, et des modèles prévoient qu'en l'état actuel des choses, au cours de ce siècle la production de CO_2 par le sol pourrait devenir supérieure à son absorption. En effet, des études montrent que le réchauffement climatique que vit actuellement notre planète pourrait avoir pour effet d'augmenter l'activité microbienne de dégradation de la matière organique dans les sols et pourrait donc augmenter la production de CO_2 (Cox *et al.* 2000 ; Xue *et al.* 2016). Il semble donc indispensable et urgent d'augmenter nos connaissances quant au fonctionnement écologique du sol afin de faire face aux défis écologiques majeurs qui nous attendent.

*“Ainsi, nous sommes agités de bien des façons
par les causes extérieures et, pareils aux flots
de la mer agités par des vents contraires, nous
flottons, inconscients de notre sort et de notre
destin.”*

– Baruch Spinoza, L’Ethique, 1677

Annexes

Quantification de biofilms formés sur des hyphes fongiques par dénombrement d'Unité Formant Colonies (UFC)

Les biofilms bactériens sur colonies fongiques sont formés selon le même protocole que celui présenté dans le chapitre 4.

Décrochage des biofilms : Après 1 h ou 14 h d'interaction chaque colonie fongique (6 réplicats biologiques) est rincée, placée dans 900 μL de tampon potassium phosphate¹⁴, puis agitée par vortex pendant 15 min à vitesse maximale.

Quantification des colonies fongiques : Après décrochage des biofilms les colonies fongiques sont récupérées, placées individuellement dans des carrés d'aluminium pré-pesés, puis mises à sécher dans une étuve à 50 °C, pour être finalement pesées sur une balance de précision.

Quantification des bactéries : En parallèle, des séries de dilutions sont réalisées à partir des suspensions de biofilms, puis 50 μL de suspension diluée sont étalés sur un milieu TSA 10 % (Tryptic soy agar, 3 g L⁻¹), en duplicats techniques.

Les cultures bactériennes sont ensuite mises à incuber à 28 °C jusqu'à l'apparition des colonies (24 à 48 h), puis les UFC sont comptées manuellement.

14. 25 g L⁻¹ de KH₂PO₄ et 2.78 g L⁻¹ de K₂HPO₄, pH 5.8

Quantification de biofilms formés sur des hyphes fongiques par PCR quantitative en temps réel (PCRq)

Les biofilms bactériens sur colonies fongiques sont formés selon le même protocole que celui présenté dans le chapitre 4 pour 1 h ou 16 h d'interaction. Le décrochage des biofilms et la quantification des colonies fongiques ont été réalisés selon le même protocole que pour la méthode de dénombrement d'UFC. Cinq réplicats biologiques ont été analysés.

Pour la quantification des bactéries les suspensions de biofilms sont centrifugées à 6000 g pendant 3 min, les surnageants sont éliminés et les culots sont conservés à -20°C jusqu'à l'analyse par PCRq. Avant la PCRq les tubes contenant les culots sont placés dans un bain marie sec, 15 min à 90°C pour la lyse des cellules, puis ils sont resuspendus dans 50 μL d'eau « DNase-free ».

Extraction d'ADN génomique de BBc6 pour servir de standard pour la PCRq : Une extraction d'ADN génomique est réalisée avec le kit Wizard genome DNA (Promega) à partir de $2 \times 4\text{mL}$ de culture de BBc6 en phase exponentielle de croissance dans du milieu Luria Bertani (LB) afin de servir de standard pour la PCRq. La suspension finale du culot d'ADN est réalisée dans 50 μL d'eau stérile « DNase free ». Les concentrations des suspensions d'ADN sont ensuite mesurées au NanoDrop (Thermo Scientific), puis les suspensions sont aliquotées par 10 μL et conservées à -20°C . Avant la PCRq une gamme d'ADN standard est réalisée avec 10 ng, 5 ng, 1 ng, 0.5 ng et 0.2 ng d'ADN.

Amplification par PCRq : L'amplification en temps réel d'un gène de ménage de BBc6 (selR Galet *et al.* 2015) a été réalisée en duplicats techniques à l'aide du kit IQTM SYBR[®] Green Supermix (BioRad) selon le protocole du fournisseur. La réaction a été réalisée dans un volume final de 15 μL contenant 2 μL de la suspension de biofilms lysés ou d'ADN standard ou d'eau pour le contrôle négatif, 2.75 μL de chacune des amorces (PBR256 et PRB257, concentration finale

= 150 nm) et 7.5 µL de IQTM SYBR[®] Green Supermix (Biorad). Les échantillons et les standards ont été analysés en duplicats techniques. Les amplifications ont été réalisées dans un thermocycleur PTC-200 DNA Engine Opticon[®] (BioRad) couplé avec un système de détection Chromo4TM (BioRad), selon le programme suivant : 3 min à 95 °C, puis 40 cycles de 3 étapes ont été effectués, 15 s à 95 °C, 1 min à 60 °C et 30 s à 72 °C, à la fin desquels la fluorescence est mesurée. Une courbe de dissociation des produits de PCR obtenus a été réalisée à la fin de des 40 cycles d'amplifications. Pour cela, une rampe de température de 65 °C à 95 °C est appliquée, durant laquelle la fluorescence est mesurée tous les 1 °C. Les résultats obtenus ont été analysés à l'aide du logiciel Opticon MonitorTM Software (BioRad) qui permet la quantification des gènes ciblés à partir de la gamme d'ADN standard. L'absence d'amplification aspécifique a été vérifiée par l'observation d'un unique pic de fusion sur les courbes de dissociations. L'efficacité de la réaction d'amplification a été estimée à 105 % selon l'équation suivante : efficacité = $10^{\frac{-1}{p}} - 1$, où p correspond à la pente de la droite de régression linéaire obtenue pour la gamme d'ADN standards.

Protocole pour l'étude de l'effet de *L. bicolor* sur la croissance de BBc6

Mise en place : Des suspensions bactériennes sont réalisées dans de l'eau stérile à partir de colonies de BBc6 ayant poussées 3 jours sur du TSA 10 % (Tryptic soy agar, 3 g L⁻¹), puis sont centrifugées 5 min à 8000 rpm. Les culots bactériens sont suspendus dans de l'eau de façon à obtenir une concentration bactérienne d'environ 10⁹ cellules.mL⁻¹.

Un morceau d'une colonie fongique prélevée avec un emporte-pièce à partir d'une culture sur milieu Pachlewski (P5)¹⁵ est déposé au centre d'une boîte de

15. Pour 1 L : 0.5 g de diNH₄ tartrate, 1 g de KH₂PO₄, 0.5 g de MgSO₄ · 7 H₂O, 5 g de Maltose D+, 20 g de Glucose D+, 1 mL de Thiamine-HCl 10 %, 0.5 mL de solution de nutriments diluée au 1/10 (6 g L⁻¹ de sulfate de fer ; 0.27 g L⁻¹ de molybdenum trioxyde ; 8.45 g L⁻¹ de d'acide borique ; 5 g L⁻¹ de sulphate de manganèse ; 5 g L⁻¹ de sulfate de cuivre ; 2.27 g L⁻¹ de sulfate de zinc) et 20 g d'agar, pH 5.5

Pétri contenant du milieu solide P20th-¹⁶. Puis, 4 gouttes de 10 µL de suspension bactérienne¹⁷ sont déposées à environ 1 cm du morceau de colonie fongique (fig 7.1 page 127). Les boîtes sont ensuite mise à incuber à 10 °C à l'obscurité pendant 4, 8 ou 14 jours.

Analyse : Après incubation, 4 carrés d'agar contenant les colonies bactériennes sont découpés dans chaque boîtes, puis placés dans des tubes à hémolyse contenant 2 mL d'eau stérile. Après une agitation au vortex pour décrocher les bactéries de l'agar, les suspension bactérienne sont placées dans un nouveaux tubes et une estimation de leur concentrations est réalisée par mesure de leur densité optique à 600nm. Des dilutions sont alors réalisées de façon à obtenir des concentrations situées entre 10⁴ et 10⁶ cellules. Les suspensions sont ensuite étalées sur du milieu TSA 10 % à l'aide d'un ensemenceur en spiral, puis incubées à 28 °C jusqu'à l'apparition des colonies (24 à 48 h). Les UFC sont alors comptées manuellement.

Création de mutants produisant de la GFP

Afin d'introduire un plasmide intégratif incluant un gène codant la GFP, un gène de résistance à un antibiotique et un transposons Tn7, dans les mutants de BBc6 ayant perdu leur effet auxiliaire, une conjugaison dite quadriparentale est réalisée avec les souches suivantes :

- Une souche donneuse : *Escherichia coli* E226 qui porte le plasmide intégratif Tn7-gfp-gent
- Une souche receveuse : Mutants de BBc6 à transformer (ces mutants portent une résistance à un antibiotique)
- Deux souches auxiliaires de la conjugaison : *E. coli* E71 et *E. coli* E307

16. Pour 1 L : 0.25 g de diNH₄ tartrate, 0.5 g de KH₂PO₄, 0.25 g de MgSO₄ · 7 H₂O, 1 g de Glucose D+, 0.5 mL de solution de nutriments diluée au 1/10 (même composition que pour le P5) et 20 g d'agar, pH 5.5

17. Ou d'eau stérile pour les contrôles négatifs

Culture des souches : Les quatre souches parentales sont mises en culture à 37 °C sur du milieu LB pour les *E. coli* et à 28 °C sur du TSA 10 % pour *P. fluorescens*. Après 48 h d'incubation, 2 ou 3 colonies isolées de chaque souche sont prélevées puis placées dans 30 mL de LB liquide. Les cultures sont ensuite incubées 16 h avec les mêmes températures d'incubation que lors de l'étape précédente.

Conjugaison : Les cultures liquides sont ensuite centrifugées 3 min à 5000 g et les culots sont suspendus dans 30 mL de LB et les suspensions sont à nouveau centrifugées. Les culots sont alors suspendus dans 2 mL d'eau stérile. Les suspensions des 4 souches parentales sont ensuite mélangées ensemble (ratio 1 : 1 : 1 : 1) pour un volume finale de 2 mL. La suspension obtenue est alors centrifugée 2 min à 5000 g et le culot est suspendu dans 100 µL d'eau stérile, puis 5 gouttes de 10 µL sont alors déposées sur un milieu TSA 10 % et mises à incuber à 28 °C pendant 16 h.

Sélection des mutants transformés : Les gouttes de suspension bactérienne sont ensuite décrochées du milieu solide en déposant 5 mL d'eau stérile sur le milieu et en frottant à l'aide d'un râteau. Puis, la suspension est récupérée et 50 µL sont étalés sur un milieu M9¹⁸ contenant l'antibiotique qui permet la sélection des mutants de BBc6 et celui permettant la sélection des bactéries portant le plasmide. Les cultures sont ensuite mises à incuber à 28 °C pendant 48 h et des colonies isolées sont prélevées et à nouveau mises en culture sur du milieu M9 avec antibiotiques pendant 48 h. La réussite de la transformation est ensuite vérifiée par microscopie à épifluorescence en observant les souches transformées avec une longueur d'onde d'excitation de 488 nm.

18. Pour 500 mL : 5 mL de glucose 20 %, 500 µL de MgSO₄ 1 M, 50 µL de CaCl₂ 1 M, 50 mL de solution saline 10X (NH₄Cl 10 g L⁻¹, Na₂HPO₄ · 7 H₂O 60 g L⁻¹, KH₂PO₄ 30 g L et NaCl 5 g L), et 7.5 g d'agar

Etude de la migration de BBc6 sur les hyphes de *L. bicolor*

Des boîtes de Pétri demi-compartmentées sont remplies pour moitié avec du milieu P5 solide (voir composition page 179) et pour moitié avec un mélange de tourbe et de vermiculite¹⁹ (ratio 1 : 1) humidifié avec du milieu P5 liquide²⁰. La partie contenant le milieu P5 solide est alors inoculée avec un morceau d'une colonie de *L. bicolor*. Les boîtes sont placées à incuber à 20 °C, à l'obscurité, jusqu'à ce que les colonies fongiques atteignent le côté des boîtes contenant la tourbe-vermiculite (fig. 7.3, p.129).

Des cultures liquides de BBc6 dans du LB liquide en phase exponentielle de croissance sont centrifugées 3 min à 5000 g. Les culots sont suspendus dans du TSA 10 % liquide de façon à obtenir une densité optique (DO) à 600 nm de 0.2, et sont placés à incuber à 28 °C, 150 rpm jusqu'à obtenir une DO de environ 0.5. Puis, 2×50 µL de suspension bactérienne sont déposés sur la tourbe-vermiculite à environ 2 mm des cultures fongiques et les boîtes sont placées à incuber à 20 °C, à l'obscurité. Cinq réplicats biologiques ont été réalisés avec BBc6 et *L. bicolor*, ainsi que 5 contrôles avec uniquement *L. bicolor* et 5 contrôles avec uniquement BBc6.

Analyse quantitative de la formation de biofilms bactériens sur surface abiotique

Formation de biofilms : Des cultures liquides de BBc6 et de ses mutants en phase exponentielle de croissance dans du LB liquide sont centrifugées 3 min à 5000 g. Les culots sont suspendus dans 500 µL de MgSO₄ (0.1 M), puis la DO à 600 nm est équilibrée à 0.1 dans du milieu King B²¹ liquide. Dans une micro-plaque de 96 puits en polystyrène, 150 µL de milieu M9 (pour le contrôle négatif)

19. préalablement autoclavé deux fois

20. 250 mL de P5 pour 600 mL de tourbe-vermiculite

21. Pour 500 mL : 10 g de protéose peptone, 0.75 g de K₂HPO₄, 7.5 g d'agar, 3 mL de MgSO₄ 1 M et 5 mL de glycérol 100 % (le MgSO₄ et le glycérol sont ajoutés après autoclavage)

ou de suspension bactérienne de chaque souche sont déposés par puits (réalisé en 5 réplicats). La micro-plaque est ensuite mise à incuber 48 h à 28 °C avec agitation (120 rpm).

Analyse quantitative : Les puits de la micro-plaques sont vidés par renversement de cette dernière. Puis, la micro-plaque est immergée dans de l'eau de façon à enlever les cellules qui n'ont pas adhéré à la surface. La micro-plaque est ensuite vidée et agitée pour éliminer le restant d'eau contenu dans les puits. Ensuite, 200 µL de cristal violet 0.1 % sont ajoutés dans chacun des puits et la micro-plaque est mise à incuber 10 min à température ambiante. Le cristal violet est ensuite retiré par renversement de la plaque et cette dernière est rincée dans 3 bains d'eau successifs, puis laissée sécher retournée sur du papier absorbant. Enfin, 200 µL d'éthanol à 95 % sont ajoutés dans chaque puits et la plaque est laissée 5 min à température ambiante afin de solubiliser le cristal violet fixé aux cellules qui sont attachées à la surface. Le contenu de chaque puits est alors transféré dans une nouvelle micro-plaque et la DO à 595 nm est mesurée dans chaque puits à l'aide d'un lecteur automatique de micro-plaque (Tecan).

Glossaire

Biolog[®] Système d'identification de bactéries par activité métabolique. 134, 135

COMSTAT Programme de quantification de structures tri-dimensionnelles dans les biofilms. 66

DNase Enzyme catalysant la dégradation des acides désoxyribonucléiques. 79, 80

FIJI FIJI Is Juste ImageJ (Schindelin *et al.* 2012). 71, 72

ImageJ Logiciel multiplate-forme et open source de traitement et d'analyse d'images (Rasband 1997-2016). 66, 71, 74, 75, 185

ISA3D Programme de quantification de structures tri-dimensionnelles dans les biofilms. 66

mCherry Protéine fluorescente de fluorescence similaire à la RFP mais ayant une plus grande stabilité. 66

Acronymes

ADN Acide Désoxyribonucléique. 9, 26, 65, 66, 68, 71, 79, 117, 119, 121, 147, 157, 158, 163, 167, 168, 170, 187

ADNe ADN extracellulaire. 79, 117, 119, 121, 163

ANOVA Analysis Of Variance. 145

ARN Acide Ribonucléique. 65, 80, 187

ARNr ARN ribosomique. 80

ATP Adénosine Triphosphate. 119

BAM Bactéries Auxiliaires de la Mycorhization. 32–34

DAPI 4',6-diamidino-2-phénylindole. 66, 94, 95, 98, 101, 117, 119, 123

DO Densité Optique. 134

ECM Ectomycorhizien. 29, 31–34, 126, 134, 161

EDTA Éthylène Diamine Tétra-Acétique. 120

GFP Green Fluorescent Protein. 66, 71, 117, 148, 149

PCR Polymerase Chain Reaction. 65, 71, 187

PCRq PCR quantitative en temps réel. 11, 65, 67–71, 76, 78, 79, 187

PGPR Plant Growth Promoting Rhizobacteria. 170

PMA Propidium Monoazide. 79

RFP Red Fluorescent Protein. 66, 185

RT-PCRq PCRq avec transcription inverse. 65, 80

T3SS Type 3 Secretion System. 139, 141, 142, 146–148

T3SS2 Second Type 3 Secretion System. 142

UFC Unité Formant Colonies. 11, 64, 65, 67–70, 76, 78, 79, 126

VMNC Viables Mais Non Cultivables. 65, 70, 79

WGA Wheat Germ Agglutinin. 117, 119

Bibliographie

- Abhishek, T., S. M. Parminder, B. Deepak et K. Ashwani. 2016. « Thiol reductive stress induces cellulose-anchored biofilm formation in *Mycobacterium tuberculosis* ». *Nature Communications* 7 (11392).
- Adam, B., G. S. Baillie et L. J. Douglas. 2002. « Mixed species biofilms of *Candida albicans* and *Staphylococcus epidermidis* ». *Journal of Medical Microbiology* 51 (4) : 344–349.
- Allesen-Holm, M., *et al.* 2006. « A characterization of DNA release in *Pseudomonas aeruginosa* cultures and biofilms ». *Molecular Microbiology* 59 (4) : 1114–1128.
- Ammann, T. W., N. Bostanci, G. N. Belibasakis et T. Thurnheer. 2013. « Validation of a quantitative real-time PCR assay and comparison with fluorescence microscopy and selective agar plate counting for species-specific quantification of an in vitro subgingival biofilm model ». *Journal of Periodontal Research* 48 (4) : 517–526.
- Aspray, T. J., E. Eirian Jones, J. M. Whipps et G. D. Bending. 2006. « Importance of mycorrhization helper bacteria cell density and metabolite localization for the *Pinus sylvestris*-*Lactarius rufus* symbiosis ». *FEMS microbiology ecology* 56 (1) : 25–33.
- Atkinson, S., *et al.* 2011. « Biofilm development on *Caenorhabditis elegans* by *Yersinia* is facilitated by quorum sensing-dependent repression of type III secretion ». *PLoS Pathogens* 7 (1).
- Balbontin, R., et H. Vlamakis. 2014. « Mutualistic interaction between *Salmonella enterica* and *Aspergillus niger* and its effects on *Zea mays* colonization ». *Microbial Biotechnology* 7 (6) : 589–600.
- Balogh-Brunstad, Z., C. K. Keller, R. A. Gill, B. T. Bormann et C. Y. Li. 2008. « The effect of bacteria and fungi on chemical weathering and chemical denudation fluxes in pine growth experiments ». *Biogeochemistry* 88 (2) : 153–167.
- Barbau-piednoir, E., *et al.* 2014. « Evaluation of viability-qPCR detection system on viable and dead *Salmonella* serovar *Enteritidis* ». *Journal of Microbiological Methods* 103 : 131–137.
- Barnes, A. M. T., K. S. Ballering et R. S. Leibman. 2012. « *Enterococcus faecalis* Produces Abundant Extracellular Structures ». *mBio ASM* 3 (4).
- Barron, G. L. 1988. « Microcolonies of bacteria as a nutrient source for lignicolous and other fungi ». *Canadian Journal of Botany* 66 (12) : 2505–2510.
- Barron, G. L. 2003. « Predatory fungi, wood decay, and the carbon cycle ». *Biodiversity* 4 (1) : 3–9.
- Beltrame, C. O., *et al.* 2015. « Inactivation of the autolysis-related genes *lrgB* and *yycI* in *staphylococcus aureus* increases cell Lysis-Dependent eDNA Release and enhances biofilm development *in vitro* and *in vivo* ». *PLoS ONE* 10 (9).
- Bender, S. F., C. Wagg et M. G. A. Van der Heijden. 2016. « An Underground Revolution: Biodiversity and Soil Ecological Engineering for Agricultural Sustainability ». *Trends in Ecology and Evolution* 31 (6) : 440–452.

- Bending, G. D., E. J. Poole, J. M. Whipps et D. J. Read. 2002. « Characterization of bacteria from *Pinus sylvestris*-*Suillus luteus* mycorrhizas and their effects on root-fungus interactions and plant growth ». *FEMS Microbiology Ecology* 39 (3) : 219–227.
- Benke, A., M. Mertig et W. Pompe. 2011. « PH- and salt-dependent molecular combing of DNA: experiments and phenomenological model PH-and salt-dependent molecular combing of DNA: experiments and phenomenological model ». *Nanotechnology* 22 (3) : e035304.
- Benoit, I., et al. 2015. « *Bacillus subtilis* attachment to *Aspergillus niger* hyphae results in mutually altered metabolism ». *Environmental Microbiology* 17 (6) : 2099–2113.
- Blasius, D., W. Feil, I. Kottke et F. Oberwinkler. 1986. « Hartig net structure and formation in fully ensheathed ectomycorrhizas ». *Nordic Journal of Botany* 6 (6) : 837–842.
- Böckelmann, U., et al. 2006. « Bacterial extracellular DNA forming a defined network-like structure ». *FEMS Microbiology Letters* 262 (1) : 31–38.
- Bolte, S., et F. P. Cordelieres. 2006. « A guided tour into subcellular colocalisation analysis in light microscopy ». *Journal of Microscopy* 224 (3) : 213–232.
- Bolwerk, A., et al. 2003. « Interactions in the Tomato Rhizosphere of Two *Pseudomonas* Bio-control Strains with the Phytopathogenic Fungus *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici* ». *Molecular Plant-Microbe Interactions* 16 (11) : 983–993.
- Boonchan, S., M. L. Britz et G. A. Stanley. 2000. « Degradation and mineralization of high molecular weight polycyclic aromatic hydrocarbons by defined fungal bacterial cocultures ». *Applied and Environmental Microbiology* 66 (3) : 1007–1019.
- Branzanti, M. B., E. Rocca et A. Pisi. 1999. « Effect of ectomycorrhizal fungi on chestnut ink disease ». *Mycorrhiza* 9 (2) : 103–109.
- Brodersen, D. E., et al. 2000. « The structural basis for the action of the antibiotics tetracycline, pactamycin, and hygromycin B, on the 30S ribosomal subunit ». *Cell* 103 (7) : 1143–1154.
- Brulé, C., et al. 2001. « Survival in the soil of the ectomycorrhizal fungus *Laccaria bicolor* and the effects of a mycorrhiza helper *Pseudomonas fluorescens* ». *Soil Biology and Biochemistry* 33 : 1683–1694.
- Brundrett, M. C. 2002. « Coevolution of Roots and Mycorrhiza of Land Plants ». *New Phytologist* 154 (2) : 275–304.
- Bucking, H., E. Liepold et P. Ambilwade. 2012. « The Role of the Mycorrhizal Symbiosis in Nutrient Uptake of Plants and the Regulatory Mechanisms Underlying These Transport Processes ». Chap. 4 dans *Plant Science*, Édité par N. K. Dhal et S. C. Sahu. InTech.
- Buée, M., et al. 2009. « 454 Pyrosequencing analyses of forest soils reveal an high fungal diversity unexpectedly ». *New Phytologist* 184 (2) : 449–456.
- Bugg, T. D. H., M. Ahmad, E. M. Hardiman et R. Singh. 2011. « The emerging role for bacteria in lignin degradation and bio-product formation ». *Current Opinion in Biotechnology* 22 (3) : 394–400.
- Burke, D. J., S. M. Dunham et A. M. Kretzer. 2008. « Molecular analysis of bacterial communities associated with the roots of Douglas fir (*Pseudotsuga menziesii*) colonized by different ectomycorrhizal fungi ». *FEMS Microbiology Ecology* 65 (2) : 299–309.

- Burke, D. J., A. M. Kretzer, P. T. Rygielwicz et M. A. Topa. 2006. « Soil bacterial diversity in a loblolly pine plantation: Influence of ectomycorrhizas and fertilization ». *FEMS Microbiology Ecology* 57 (3) : 409–419.
- Burmølle, M., A. H. Kjølner et S. J. Sørensen. 2012. « An invisible workforce : biofilms in the soil ». Dans *Microbial biofilms: current research and applications*, Édité par Gavin Lear and Lewis, 53 : 61–71. 9. Caister Academic Press.
- Calvaruso, C., *et al.* 2010. « Influence of Forest Trees on the Distribution of Mineral Weathering-Associated Bacterial Communities of the *Scleroderma citrinum* Mycorrhizosphere ». *Applied and Environmental Microbiology* 76 (14) : 4780–4787.
- Campbell, E. A., *et al.* 2001. « Structural mechanism for rifampicin inhibition of bacterial RNA polymerase. » *Cell* 104 (6) : 901–912.
- Cardon, Z.G., et J.L. Whitbeck. 2007. *The Rhizosphere: An Ecological Perspective*. Elsevier, 1219–1220.
- Cerca, N., F. Gomes, S. Pereira, P. Teixeira et R. Oliveira. 2012. « Confocal laser scanning microscopy analysis of *S. epidermidis* biofilms exposed to farnesol, vancomycin and rifampicin ». *BMC Research Notes* 5 : 244.
- Cerigini, E., F. Palma, E. Barbieri, M. Buffalini et V. Stocchi. 2008. « The *Tuber borchii* fruiting body-specific protein TBF-1, a novel lectin which interacts with associated *Rhizobium* species ». *FEMS Microbiology Letters* 284 (2) : 197–203.
- Chernin, L., Z. Ismailov, S. Haran et I. Chet. 1995. « Chitinolytic *Enterobacter agglomerans* antagonistic to fungal plant pathogens ». *Applied and Environmental Microbiology* 61 (5) : 1720–1726.
- Chiba, A., S. Sugimoto, F. Sato, S. Hori et Y. Mizunoe. 2015. « A refined technique for extraction of extracellular matrices from bacterial biofilms and its applicability ». *Microbial Biotechnology* 8 (3) : 392–403.
- Choy, W., L. Zhou, C. K. Syn, L. Zhang et S. Swarup. 2004. « MorA Defines a New Class of Regulators Affecting Flagellar Development and Biofilm Formation in Diverse *Pseudomonas* Species ». *Journal of Bacteriology* 186 (21) : 7221–7228.
- Condron, L., C. Stark, M. O’Callaghan, P. Clinton et Z. Huang. 2010. « The Role of Microbial Communities in the Formation and Decomposition of Soil Organic Matter ». Dans *Soil Microbiology and Sustainable Crop Production*, Édité par G.R. Dixon et Emma L. Tilston, 81–118. Springer Netherlands.
- Coombes, B. K. 2009. « Type III secretion systems in symbiotic adaptation of pathogenic and non-pathogenic bacteria ». *Trends in Microbiology* 17 (3) : 89–94.
- Courty, P. E., *et al.* 2010. « The role of ectomycorrhizal communities in forest ecosystem processes: New perspectives and emerging concepts ». *Soil Biology and Biochemistry* 42 : 679–698.
- Coutard, F., M. Pommepuy, S. Loaec et D. Hervio-Heath. 2005. « mRNA detection by reverse transcription-PCR for monitoring viability and potential virulence in a pathogenic strain of *Vibrio parahaemolyticus* in viable but nonculturable state ». *Journal of Applied Microbiology* 98 (4) : 951–961.

- Cox, P. M., R. A. Betts, C. D. Jones, S. A. Spall et I. J. Totterdell. 2000. « Acceleration of global warming due to carbon-cycle feedbacks in a coupled climate model ». *Nature* 408 (6809) : 184–187.
- Cumming, J. R., T. D. Swiger, B. S. Kurnik et D. G. Panaccione. 2001. « Organic acid exudation by *Laccaria bicolor* and *Pisolithus tinctorius* exposed to aluminum *in vitro* ». *Canadian Journal of Forest Research* 31 (4) : 703–710.
- Cusano, A. M., et al. 2011. « *Pseudomonas fluorescens* BBc6R8 type III secretion mutants no longer promote ectomycorrhizal symbiosis ». *Environmental microbiology reports* 3 (2) : 203–210.
- Da Silva Meira, Q. G., I. De Medeiros Barbosa, A. J. Alves Aguiar Athayde, J. P. de Siqueira-Júnior et E. L. de Souza. 2012. « Influence of temperature and surface kind on biofilm formation by *Staphylococcus aureus* from food-contact surfaces and sensitivity to sanitizers ». *Food Control* 25 (2) : 469–475.
- Dance, A. 2008. « What lies beneath ». *Nature* 455 (9) : 724–726.
- Das, T., et M. Manefield. 2012. « Pyocyanin Promotes Extracellular DNA Release in *Pseudomonas aeruginosa* ». *PLoS ONE* 7 (10).
- De Boer, W., L. B. Folman, R. C. Summerbell et L. Boddy. 2005. « Living in a fungal world: Impact of fungi on soil bacterial niche development ». *FEMS Microbiology Reviews* 29 (4) : 795–811.
- De Boer, W., Paulien J. A. Klein G., G. A. Kowalchuk et J. A. Van Veen. 2001. « Growth of Chitinolytic Dune Soil β -Subclass Proteobacteria in Response to Invading Fungal Hyphae ». *Applied and Environmental Microbiology* 67 (8) : 3358–3362.
- De Buhr, N., et M. Von Köckritz-blickwede. 2016. « How Neutrophil Extracellular Traps Become Visible ». *Journal of Immunology Research* 2016.
- De Carvalho, M. P., et al. 2016. « Coprinuslactone protects the edible mushroom *Coprinus comatus* against biofilm infections by blocking both quorum-sensing and MurA ». *Environmental Microbiology* 18 : 4254–4264.
- De Weert, S., I. Kuiper, E. L. Lagendijk, G. E. M. Lamers et B. J. J. Lugtenberg. 2004. « Role of Chemotaxis Toward Fusaric Acid in Colonization of Hyphae of *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici* by *Pseudomonas fluorescens* WCS365 ». *The American Phytopathological Society* 17 (11) : 1185–1191.
- Deveau, A., A. Kohler, P. Frey-Klett et F. Martin. 2008. « The major pathways of carbohydrate metabolism in the ectomycorrhizal basidiomycete *Laccaria bicolor* S238N ». *New Phytologist* 180 (2) : 379–390.
- Deveau, A., et al. 2007. « The mycorrhiza helper *Pseudomonas fluorescens* BBc6R8 has a specific priming effect on the growth, morphology and gene expression of the ectomycorrhizal fungus *Laccaria bicolor* S238N ». *The New phytologist* 175 (4) : 743–755.
- Deveau, A., et al. 2010. « Role of fungal trehalose and bacterial thiamine in the improved survival and growth of the ectomycorrhizal fungus *Laccaria bicolor* S238N and the helper bacterium *Pseudomonas fluorescens* BBc6R8 ». *Environmental microbiology reports* 2 (4) : 560–568.
- Deveau, A., et al. 2014. « Genome Sequence of the Mycorrhizal Helper Bacterium *Pseudomonas fluorescens* BBc6R8 ». *Genome announcements* 2 (1).

- Deveau, A., *et al.* 2014. « Pairwise Transcriptomic Analysis of the Interactions Between the Ectomycorrhizal Fungus *Laccaria bicolor* S238N and Three Beneficial, Neutral and Antagonistic Soil Bacteria ». *Microbial Ecology* 69 (1) : 146–159.
- Deveau, A., *et al.* 2016. « Role of secondary metabolites in the interaction between *Pseudomonas fluorescens* and soil microorganisms under iron-limited conditions ». *FEMS Microbiology Ecology* 92 (8) : 1–11.
- Deveau, A., *et al.* 2016. « Temporal changes of bacterial communities in the *Tuber melanosporum* ectomycorrhizosphere during ascocarp development ». *Mycorrhiza* 26 (5) : 389–399.
- Dixon, G.R., et E. L. Tilston. 2010. « Soil-Borne Pathogens and Their Interactions with the Soil Environment ». Dans *Soil Microbiology and Sustainable Crop Production*, Édité par G.R. Dixon et E. L. Tilston, 197–271. Springer Netherlands.
- Donlan, R. M. 2002. « Biofilms: Microbial life on surfaces ». *Emerging Infectious Diseases* 8 (9) : 881–890.
- Dorioz, J. M., M. Robert et C. Chenu. 1993. « The Role of Roots, Fungi and Bacteria on Clay Particle Organization. An Experimental Approach ». *Geoderma* 56 (1–4) : 179–194.
- Driouch, A., M. L. Follet-Gueye, M. Vicré-Gibouin et M. Hawes. 2013. « Root border cells and secretions as critical elements in plant host defense ». *Current Opinion in Plant Biology* 16 (4) : 489–495.
- Dufour, D., V. Leung et C. M. Lévesque. 2012. « Bacterial biofilm : structure, function, and antimicrobial resistance ». *Endodontic Topics* 22 : 2–16.
- Dunstan, W. A., N. Malajczuk et B. Dell. 1998. « Effects of bacteria on mycorrhizal development and growth of container grown *Eucalyptus diversicolor* F. Muell. seedlings ». *Plant and Soil* 201 (2) : 241–249.
- Duponnois, R., et J. Garbaye. 1991. « Mycorrhization helper bacteria associated with the Douglas fir-*Laccaria laccata* symbiosis: effects in aseptic and in glasshouse conditions ». *Annales des sciences forestières INRA/EDP Sciences* 48 : 239–251.
- Duponnois, R., et C. Plenchette. 2003. « A mycorrhiza helper bacterium enhances ectomycorrhizal and endomycorrhizal symbiosis of Australian Acacia species ». *Mycorrhiza* 13 (2) : 85–91.
- Essig, A., *et al.* 2014. « Copsin, a novel peptide-based fungal antibiotic interfering with the peptidoglycan synthesis ». *Journal of Biological Chemistry* 289 (50) : 34953–34964.
- Estrela, A., et W. R. Abraham. 2016. « Fungal Metabolites for the Control of Biofilm Infections ». *Agriculture* 6 (3) : 37.
- Fazli, M., *et al.* 2014. « Regulation of biofilm formation in *Pseudomonas* and *Burkholderia* species ». *Environmental microbiology* 16 (7) : 1961–1981.
- Fernandes, R. A., *et al.* 2016. « Biofilm formation by *Candida albicans* and *Streptococcus mutans* in the presence of farnesol: a quantitative evaluation ». *Biofouling* 32 (3) : 329–338.
- Flemming, H. C., et J. Wingender. 2010. « The biofilm matrix ». *Nature Publishing Group* 8 (9) : 623–633.
- Founoune, H., *et al.* 2002. « Mycorrhiza Helper Bacteria stimulate ectomycorrhizal symbiosis of *Acacia holosericea* with *Pisolithus alba* ». *New Phytologist* 153 (1) : 81–89.

- Freitas, A. I., C. Vasconcelos, M. Vilanova et N. Cerca. 2014. « Optimization of an automatic counting system for the quantification of *Staphylococcus epidermidis* cells in biofilms ». *Journal of Basic Microbiology* 54 (7) : 750–757.
- Frey, P., P. Frey-Klett, J. Garbaye, O. Berge et T. Heulin. 1997. « Metabolic and Genotypic Fingerprinting of Fluorescent Pseudomonads Associated with the Douglas Fir-*Laccaria bicolor* Mycorrhizosphere ». *Applied And Environmental Microbiology* 63 (5) : 1852–1860.
- Frey-Klett, P. 1996. « Écologie d'un *Pseudomonas fluorescens* auxiliaire de la mycorhization ». Thèse de doct.
- Frey-Klett, P., J. L. Churin, J. C. Pierrat et J. Garbaye. 1999. « Dose effect in the dual inoculation of an ectomycorrhizal fungus and a mycorrhiza helper bacterium in two forest nurseries ». *Soil Biology and Biochemistry* 31 : 1555–1562.
- Frey-Klett, P., J. Garbaye et M. Tarkka. 2007. « The mycorrhiza helper bacteria revisited ». *The New phytologist* 176 (1) : 22–36.
- Frey-Klett, P., J. C. Pierrat et J. Garbaye. 1997. « Location and Survival of Mycorrhiza Helper *Pseudomonas fluorescens* during Establishment of Ectomycorrhizal Symbiosis between *Laccaria bicolor* and Douglas Fir ». *Applied and Environmental Microbiology* 63 (1) : 139–144.
- Frey-Klett, P., et al. 2005. « Ectomycorrhizal symbiosis affects functional diversity of rhizosphere fluorescent *pseudomonads* ». *New Phytologist* 165 (1) : 317–328.
- Frey-Klett, P., et al. 2011. « Bacterial-Fungal Interactions: Hyphens between Agricultural, Clinical, Environmental, and Food Microbiologists ». *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 75 (4) : 583–609.
- Galet, J., et al. 2015. « *Pseudomonas fluorescens* pirates both ferrioxamine and ferricoelichelin Siderophores from *Streptomyces ambofaciens* ». *Applied and Environmental Microbiology* 81 (9) : 3132–3141.
- Gamalero, E., et al. 2003. « Characterization of functional traits of two fluorescent pseudomonads isolated from basidiomes of ectomycorrhizal fungi ». *Soil Biology and Biochemistry* 35 (1) : 55–65.
- Garbaye, J. 1994. « Helper bacteria: a new dimension to the mycorrhizal symbiosis ». *New Phytologist* 128 (2) : 197–210.
- Gazi, A. D., et al. 2012. « Phylogenetic analysis of a gene cluster encoding an additional, rhizobial-like type III secretion system that is narrowly distributed among *Pseudomonas syringae* strains ». *BMC Microbiology* 12 : 188.
- Gloag, E. S., et al. 2013. « Self-organization of bacterial biofilms is facilitated by extracellular DNA ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 110 (28) : 11541–11546.
- Gougoulas, C., J. M. Clark et L. J. Shaw. 2014. « The role of soil microbes in the global carbon cycle: Tracking the below-ground microbial processing of plant-derived carbon for manipulating carbon dynamics in agricultural systems ». *Journal of the Science of Food and Agriculture* 94 (12) : 2362–2371.
- Grande, R., et al. 2011. « Extracellular DNA in *Helicobacter pylori* biofilm: A backstairs rumour ». *Journal of Applied Microbiology* 110 (2) : 490–498.

- Guilbaud, M., P. Piveteau, M. Desvaux, S. Brisse et R. Briandet. 2015. « Exploring the diversity of *Listeria monocytogenes* biofilm architecture by high-throughput confocal laser scanning microscopy and the predominance of the honeycomb-like morphotype ». *Applied and Environmental Microbiology* 81 (5) : 1813–1819.
- Haq, I. U., P. Da Rocha Calixto Renata Oliveira Yang, G. M. Pires dos Santos et J. D. Van Elsas. 2016. « Chemotaxis and adherence to fungal surfaces are key components of the behavioral response of *Burkholderia terrae* BS001 to two selected soil fungi ». *FEMS Microbiology Ecology* 92 (11) : 1–32.
- Hastings, A., et L. J. Gross. 2012. *Encyclopedia of Theoretical Ecology*. Édité par University of California Press. 1–2. University of California Press.
- Hengge, R. 2009. « Principles of c-di-GMP signalling in bacteria ». *Nature Reviews Microbiology* 7 (4) : 263–273.
- Hildebrandt, U., F. Ouziad, F. J. Marner et H. Bothe. 2006. « The bacterium *Paenibacillus validus* stimulates growth of the arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus intraradices* up to the formation of fertile spores ». *FEMS Microbiology Letters* 254 (2) : 258–267.
- Hogan, D. A., et R. Kolter. 2002. « *Pseudomonas* - *Candida* interactions: an ecological role for virulence factors ». *Science* 296 (5576) : 2229–2232.
- Hogan, D., M. Wargo et N. Beck. 2007. « Bacterial Biofilms on Fungal Surfaces 13 ». Dans *The biofilm mode of life: mechanisms and adaptations.2*, 235–245.
- Hopkins, D. W., et J. A.J. Dungait. 2010. « Soil Microbiology and Nutrient Cycling ». Dans *Soil Microbiology and Sustainable Crop Production*, Édité par G.R. Dixon et E. L. Tilton, 59–80. Springer Netherlands.
- Ideses, D., et al. 2005. « A Degenerate Type III Secretion System from Septicemic *Escherichia coli* Contributes to Pathogenesis ». *Journal of Bacteriology* 187 (23) : 8164–8171.
- Ingham, C. J., O. Kalisman, A. Finkelshtein et E. Ben-Jacob. 2011. « Mutually facilitated dispersal between the nonmotile fungus *Aspergillus fumigatus* and the swarming bacterium *Paenibacillus vortex* ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 108 (49) : 19731–19736.
- Jefferson, K. K. 2004. « What drives bacteria to produce a biofilm? » *FEMS Microbiology Letters* 236 (2) : 163–173.
- Kerfahi, D., B. Tripathi, J. Junghoon Lee, D. P. Edwards et J.M. Adams. 2014. « The impact of selective-logging and forest clearance for oil palm on fungal communities in Borneo ». *PLoS ONE* 9 (11) : 1–8.
- Klinger-Strobel, M., H. Suesse, D. Fischer, M. W. Pletz et O. Makarewicz. 2016. « A Novel Computerized Cell Count Algorithm for Biofilm Analysis ». *PloS one* 11 (5).
- Kobayashi, D. Y., et J. A. Crouch. 2009. « Bacterial / Fungal Interactions : From Pathogens to Mutualistic Endosymbionts ». 47 : 63–82.
- Koechler, S., J. Farasin, J. Cleiss-Arnold et F. Arsène-Ploetze. 2015. « Toxic metal resistance in biofilms: Diversity of microbial responses and their evolution ». *Research in Microbiology* 166 (10) : 764–773.
- Kohler, A., et al. 2015. « Convergent losses of decay mechanisms and rapid turnover of symbiosis genes in mycorrhizal mutualists ». *Nature Genetics* 47 (4) : 410–5.

- Kohlmeier, S., *et al.* 2005. « Taking the fungal highway: Mobilization of pollutant-degrading bacteria by fungi ». *Environmental Science and Technology* 39 (12) : 4640–4646.
- Koide, R. T., C. Fernandez et G. Malcolm. 2014. « Determining place and process: functional traits of ectomycorrhizal fungi that affect both community structure and ecosystem function ». *New Phytologist* 201 (2) : 433–439.
- Kuchma, S. L., J. P. Connolly et G. A. O. Toole. 2005. « A Three-Component Regulatory System Regulates Biofilm Maturation and Type III Secretion in *Pseudomonas aeruginosa* ». *Journal of Bacteriology* 187 (4) : 1441–1454.
- Kurth, F., *et al.* 2013. « Detection and quantification of a mycorrhization helper bacterium and a mycorrhizal fungus in plant-soil microcosms at different levels of complexity ». *BMC Microbiology* 13 : 205.
- Labbé, J. L., D. J. Weston, N. Dunkirk, D. A. Pelletier et G. A. Tuskan. 2014. « Newly identified helper bacteria stimulate ectomycorrhizal formation in *Populus* ». *Frontiers in Plant Science* 5 : 579.
- Lackner, G., N. Moebius et C. Hertweck. 2010. « Endofungal bacterium controls its host by an hrp type III secretion system ». *The ISME Journal* 5 (10) : 252–261.
- Lagrange, H., C. Jay-Allmand et F. Lapeyrie. 2001. « Rutin, the phenolglycoside from *Eucalyptus* root exudates, stimulates *Pisolithus* hyphal growth at picomolar concentrations ». *New Phytologist* 149 (2) : 349–355.
- Landeweert, R., T. W. Kuyper, E. Hoffland, N. Van Breemen et R. D. Finlay. 2001. « Linking plants to rocks: ectomycorrhizal fungi mobilize nutrients from minerals ». *Trends in Ecology & Evolution* 16 (5) : 248–254.
- Le Quéré, A., D. P. Wright, B. Söderström, A. Tunlid et T. Johansson. 2005. « Global patterns of gene regulation associated with the development of ectomycorrhiza between birch (*Betula pendula* Roth.) and *Paxillus involutus* (Batsch) Fr. » *Molecular Plant-Microbe Interactions* 18 (7) : 659–673.
- Le Tacon, F., et D. Bouchard. 1986. « Effects of different ectomycorrhizal fungi on growth of larch, Douglas fir, Scots pine and Norway spruce seedlings in fumigated nursery soils ». *Acta Oecologica Oecologia Applicata* 4 (7) : 389–402.
- Lee, K., *et al.* 2013. « Spread and change in stress resistance of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O157 on fungal colonies ». *Microbial Biotechnology* 7 (6) : 621–629.
- Lehr, N. A., S. D. Schrey, R. Bauer, R. Hampp et M. T. Tarkka. 2007. « Suppression of plant defence response by a mycorrhiza helper bacterium ». *The New Phytologist* 174 (4) : 892–903.
- Lepanto, P., F. Lecumberry, J. Rossello et A. Kierbel. 2014. « A confocal microscopy image analysis method to measure adhesion and internalization of *Pseudomonas aeruginosa* multicellular structures into epithelial cells ». *Molecular and Cellular Probes* 28 (1) : 1–5.
- Li, L., N. Mendis, H. Trigui, J. D. Oliver et S. P. Faucher. 2014. « The importance of the viable but non-culturable state in human bacterial pathogens ». *Frontiers in Microbiology* 5 : 258.
- Li, X., Z. Yan, J. X. Correspondence et J. Xu. 2003. « Quantitative variation of biofilms among strains in natural populations of *Candida albicans* ». *Microbiology* 149 : 353–362.

- Liao, S., *et al.* 2014. « *Streptococcus mutans* extracellular DNA is upregulated during growth in biofilms, actively released via membrane vesicles, and influenced by components of the protein secretion machinery ». *Journal of Bacteriology* 196 (13) : 2355–2366.
- López-Mondéjar, R., D. Zühlke, D. Becher, K. Riedel et P. Baldrian. 2016. « Cellulose and hemicellulose decomposition by forest soil bacteria proceeds by the action of structurally variable enzymatic systems ». *Scientific Reports* 6 : 25279.
- Maier, A., J. Riedlinger, F. Hans-Peter et R. Hampp. 2004. « Actinomycetales bacteria from a spruce stand: characterization and effects on growth of root symbiotic and plant parasitic soil fungi in dual culture ». *Mycological Progress* 3 (May) : 129–136.
- Marschner, P., et Z. Rengel. 2007. *Nutrient Cycling in Terrestrial Ecosystems*. T. 10.
- Martin, F., D. Canet, J. P. Marchal et J. Brondeau. 1984. « *In Vivo* Natural-Abundance C Nuclear Magnetic Resonance Studies of Living Ectomycorrhizal Fungi: Observation of Fatty Acids in *Cenococcum graniforme* and *Hebeloma crustuliniforme* ». *Plant physiology* 75 (1) : 151–153.
- Martin, F., *et al.* 2008. « The genome of *Laccaria bicolor* provides insights into mycorrhizal symbiosis ». *Nature* 452 (7183) : 88–92.
- Matz, C., *et al.* 2005. « Biofilm formation and phenotypic variation enhance predation-driven persistence of *Vibrio cholerae* ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102 (46) : 16819–16824.
- Mavrodi, D. V., *et al.* 2011. « Structural and functional analysis of the type III secretion system from *Pseudomonas fluorescens* Q8r1-96 ». *Journal of Bacteriology* 193 (1) : 177–89.
- Meissner, A., *et al.* 2007. « *Pseudomonas aeruginosa* cupA-encoded fimbriae expression is regulated by a GGDEF and EAL domain-dependent modulation of the intracellular level of cyclic diguanylate ». *Environmental Microbiology* 9 (10) : 2475–2485.
- Mendes, R., P. Garbeva et J. M. Raaijmakers. 2013. « The Rhizosphere microbiome: Significance of Plant Beneficial, Plant Pathogenic, and Human Pathogenic Microorganisms ». *FEMS Microbiology Reviews* 37 (5) : 634–663.
- Merritt, J. H., D. E. Kadouri et G. A. O'Toole. 2011. « Growing and analyzing static biofilms ». Dans *Current Protocols in Microbiology*, 1–18.
- Minh Tran, T., A. MacIntyre, D. Khokhani, M. C. Hawes et C. Allen. 2016. « Extracellular DNases of *Ralstonia solanacearum* modulate biofilms and facilitate bacterial wilt virulence ». *Environmental Microbiology and Environmental Microbiology Reports* 18 (11) : 4103–4117.
- Mohan, V., R. Nivea et S. Menon. 2015. « Evaluation of Ectomycorrhizal Fungi as Potential Bio-control Agents against Selected Plant Pathogenic Fungi ». *Journal of Academia and Industrial Research* 3 (9) : 408–412.
- Mulcahy, H., L. Charron-Mazenod et S. Lewenza. 2008. « Extracellular DNA chelates cations and induces antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms ». *PLoS Pathogens* 4 (11).
- Nadell, C. D., K. Drescher, N. S. Wingreen et B. L. Bassler. 2015. « Extracellular matrix structure governs invasion resistance in bacterial biofilms ». *The ISME Journal* 9 (8) : 1700–1709.

- Nazir, R., D. I. Tazetdinova et J. D. Van Elsas. 2014. « *Burkholderia terrae* BS001 migrates proficiently with diverse fungal hosts through soil and provides protection from antifungal agents ». *Frontiers in Microbiology* 5 (598) : 1–10.
- Nazir, R., J. A. Warmink, H. Boersma et J. D. Van Elsas. 2010. « Mechanisms that promote bacterial fitness in fungal-affected soil microhabitats ». *FEMS Microbiology Ecology* 71 (2) : 169–185.
- Nehls, U., F. Göhringer, S. Wittulsky et S. Dietz. 2010. « Fungal carbohydrate support in the ectomycorrhizal symbiosis: A review ». *Plant Biology* 12 (2) : 292–301.
- Neu, T. R., et J. R. Lawrence. 2015. « Innovative techniques, sensors, and approaches for imaging biofilms at different scales ». *Trends in Microbiology* 23 (4) : 233–242.
- Nurmiaho-Lassila, E., S. Timonen, K. Haahtela et R. Sen. 1997. « Bacterial colonization patterns of intact *Pinus sylvestris* mycorrhizospheres in dry pine forest soil: an electron microscopy study ». *Canadian Journal of Microbiology* 43 (11) : 1017–1035.
- Ogle, H., et J. Brown. 1997. « Plant-Microbe Symbiosis ». Dans *Plant Pathogens and Plant Diseases*, Édité par JF Brown et HJ Ogle, 20–37. Rockvale.
- Okabe, S., Y. Nakamura et H. Satoh. 2012. « Community Structure and *In Situ* Activity of Nitrifying Bacteria in *Phragmites* Root-Associated Biofilms ». *Microbes and Environments* 27 (3) : 242–249.
- Pantanello, F., P. Valenti, T. Natalizi, D. Passeri et F. Berlutti. 2013. « Analytical techniques to study microbial biofilm on abiotic surfaces: *pros* and *cons* of the main techniques currently in use ». *Annali di Igiene* 25 (1) : 31–42.
- Park, K. S., *et al.* 2004. « Functional Characterization of Two Type III Secretion Systems of *Vibrio parahaemolyticus* ». *Infection And Immunity* 72 (11) : 6659–6665.
- Peres De Carvalho, M., P. Turck et W. R. Abraham. 2015. « Secondary Metabolites Control the Associated Bacterial Communities of Saprophytic Basidiomycotina Fungi ». *Microbes and Environments* 30 (2) : 196–198.
- Pérez, J., J. Muñoz-Dorado, T. De La Rubia et J. Martinez. 2002. « Biodegradation and biological treatments of cellulose, hemicellulose and lignin: An overview ». *International Microbiology* 5 (2) : 53–63.
- Peterson, R. L., et H. B. Massicotte. 2004. « Exploring structural definitions of mycorrhizas, with emphasis on nutrient-exchange interfaces ». *Canadian Journal of Botany* 82 (8) : 1074–1088.
- Phillips, R. P., E. Brzostek et M. G. Midgley. 2013. « The mycorrhizal-associated nutrient economy: a new framework for predicting carbon-nutrient couplings in temperate forests ». *The New phytologist* 199 (1) : 41–51.
- Phippen, C. W., *et al.* 2014. « Formation and dimerization of the phosphodiesterase active site of the *Pseudomonas aeruginosa* MorA, a bi-functional c-di-GMP regulator ». *FEBS Letters* 588 (24) : 4631–4636.
- Pion, M., *et al.* 2013. « Bacterial farming by the fungus *Morchella crassipes* ». *Proceedings of the Royal Society B* 280 (1773) : 20132242.
- Pion, M., *et al.* 2013. « Gains of bacterial flagellar motility in a fungal world ». *Applied and Environmental Microbiology* 79 (22) : 6862–6867.

- Pitts, B., M. A. Hamilton, N. Zilver et P. S. Stewart. 2003. « A microtiter-plate screening method for biofilm disinfection and removal ». *Journal of Microbiological Methods* 54 (2) : 269–276.
- Plett, J. M., et F. Martin. 2012. « Poplar root exudates contain compounds that induce the expression of MiSSP7 in *Laccaria bicolor* ». *Plant Signaling & Behavior* 7 (1) : 12–15.
- Pliego, C., et al. 2008. « Two similar enhanced root-colonizing *Pseudomonas* strains differ largely in their colonization strategies of avocado roots and *Rosellinia necatrix* hyphae ». *Environmental Microbiology* 10 (12) : 3295–3304.
- Pompilio, A., et al. 2015. « New insights in *Staphylococcus pseudintermedius* pathogenicity: antibiotic-resistant biofilm formation by a human wound-associated strain ». *BMC microbiology* 15 : 109.
- Preston, G. M. 2007. « Metropolitan microbes: type III secretion in multihost symbionts ». *Cell host & microbe* 2 (5) : 291–294.
- Raaijmakers, J. M., M. Vlami et J. T. de Souza. 2002. « Antibiotic production by bacterial biocontrol agents ». *Antonie Van Leeuwenhoek International Journal of General and Molecular Microbiology* 81 (1-4) : 537–547.
- Rajaraman, Nithyalakshmy. 2013. « a Study on the Diversity and Production of Microbial Extracellular Nucleases : Potential Anti-Biofilm Enzymes ». Thèse de doct.
- Rasband, W.S (US. National Institutes of Health; Bethesda; Maryland; USA). 1997-2016. *imagej*. <http://imagej.nih.gov/ij/>.
- Rasmussen, T. B., et al. 2005. « Identity and effects of quorum-sensing inhibitors produced by *Penicillium* species ». *Microbiology* 151 (5) : 1325–1340.
- Read, D. J. 1991. « Mycorrhizas in ecosystems ». *Experientia* 47 (4) : 376–391.
- Ren, C. P., et al. 2004. « The ETT2 gene cluster, encoding a second type III secretion system from *Escherichia coli*, is present in the majority of strains but has undergone widespread mutational attrition ». *Journal of Bacteriology* 186 (11) : 3547–3560.
- Riedlinger, J., et al. 2006. « Auxofuran, a novel metabolite that stimulates the growth of fly agaric, is produced by the mycorrhiza helper bacterium *Streptomyces* strain AcH 505 ». *Applied and Environmental Microbiology* 72 (5) : 3550–3557.
- Roesch, L. F. W., et al. 2007. « Pyrosequencing Enumerates and Contracts Soil Microbial Diversity ». *ISME Journal* 1 (4) : 283–290.
- Rose, S. J., L. M. Babrak et L. E. Bermudez. 2015. « *Mycobacterium avium* possesses extracellular DNA that contributes to biofilm formation, structural integrity, and tolerance to antibiotics ». *PLoS ONE* 10 (5) : 1–17.
- Rousseau, J. V. D., D. M. Sylvia et A. J. Fox. 1994. « Contribution of ectomycorrhiza to the potential nutrient-absorbing surface of pine ». *New Phytologist* 128 (4) : 639–644.
- Sarand, I., et al. 1998. « Microbial biofilms and catabolic plasmid harbouring degradative fluorescent pseudomonads in Scots pine mycorrhizospheres developed on petroleum contaminated soil ». *FEMS Microbiology Ecology* 27 (2) : 115–126.
- Sauer, K. 2003. « The genomics and proteomics of biofilm formation ». *Genome Biology* 4 (6) : 219.

- Schafer, A., *et al.* 1998. « Transport of bacteria in unsaturated porous media ». *Journal of Contaminant Hydrology* 33 (33) : 149–16.
- Scherlach, K., K. Graupner et C. Hertweck. 2013. « Molecular bacteria-fungi interactions: effects on environment, food, and medicine ». *Annual Review of Microbiology* 67 (janvier) : 375–397.
- Scheublin, T. R., I. R. Sanders, C. Keel et J. R. Van der Meer. 2010. « Characterisation of microbial communities colonising the hyphal surfaces of arbuscular mycorrhizal fungi ». *The ISME journal* 4 (6) : 752–763.
- Schindelin, J., *et al.* 2012. « Fiji: an open-source platform for biological-image analysis ». *Nature Methods* 9 (7) : 676–682.
- Schmitz, C., *et al.* 2014. « Current automated 3D cell detection methods are not a suitable replacement for manual stereologic cell counting ». *Frontiers in Neuroanatomy* 8 : 27.
- Schrey, S. D., M. Schellhammer, M. Ecke, R. Hampp et M. T. Tarkka. 2005. « Mycorrhiza helper bacterium *Streptomyces* AcH 505 induces differential gene expression in the ectomycorrhizal fungus *Amanita muscaria* ». *New Phytologist* 168 (1) : 205–216.
- Schrey, S. D., *et al.* 2007. « Interaction with mycorrhiza helper bacterium *Streptomyces* sp. AcH 505 modifies organisation of actin cytoskeleton in the ectomycorrhizal fungus *Amanita muscaria* (fly agaric) ». *Current Genetics* 52 (2) : 77–85.
- Schulz, B. J. E., C. J. C. Boyle et T. N. Sieber. 2006. *Microbial Root Endophytes*. Édité par B. J. E. Schulz, C. J. C. Boyle et T. N. Sieber. 9. Springer Berlin Heidelberg.
- Sebastiana, M., *et al.* 2014. « Oak root response to ectomycorrhizal symbiosis establishment: RNA-Seq derived transcript identification and expression profiling ». *PloS ONE* 9 (5).
- Seneviratne, G., N. S. Tennakoon, K. A. Nandasena et M. L. M. A. W. Weerasekarak. 2006. « Polyethylene biodegradation by a developed *Penicillium-Bacillus* biofilm ». *Current Science* 90 (1) : 20–21.
- Setälä, H. 1995. « Growth of Birch and Pine Seedlings in Relation to Grazing by Soil Fauna on Ectomycorrhizal Fungi ». *Ecology* 76 (6) : 1844–1851.
- Sha, Q., D. A. Vattam, M. R. J. Forstner et D. Hahn. 2013. « Quantifying *Salmonella* Population Dynamics in Water and Biofilms ». *Microbial Ecology* 65 (1) : 60–67.
- Sheridan, G. E. C., C. I. Masters, J. A. Shallcross et B. M. Mackey. 1998. « Detection of mRNA by reverse transcription-PCR as indicator of viability in *Escherichia coli* cells ». *Applied and Environmental Microbiology* 64 (4) : 1313–1318.
- Sikorski, J. 2015. « The Prokaryotic Biology of Soil ». *Soil Organisms* 87 (1) : 1–28.
- Six, J., H. Bossuyt, S. Degryze et K. Denef. 2004. « A history of research on the link between (micro)aggregates, soil biota, and soil organic matter dynamics ». *Soil and Tillage Research* 79 (1) : 7–31.
- Six, J., S. D. Frey, R. K. Thiet et K. M. Batten. 2006. « Bacterial and Fungal Contributions to Carbon Sequestration in Agroecosystems ». *Soil Science Society of America Journal* 70 (2) : 555.
- Sizemore, R. K., J. J. Caldwell et A. S. Kendrick. 1990. « Alternate gram staining technique using a fluorescent lectin ». *Applied and Environmental Microbiology* 56 (7) : 2245–2247.

- Smith, C. J., et A. M. Osborn. 2009. « Advantages and limitations of quantitative PCR (Q-PCR)-based approaches in microbial ecology ». *FEMS Microbiology Ecology* 67 (1) : 6–20.
- Smith, Sally E, et David Read. 2008. *Mycorrhizal Symbiosis (Third Edition)*. Édité par D.B.T. Read. Academic Press.
- Srivastava, D., et C. M. Waters. 2012. « A tangled web: Regulatory connections between quorum sensing and cyclic Di-GMP ». *Journal of Bacteriology* 194 (17) : 4485–4493.
- Steinberger, R. E., et P. A. Holden. 2005. « Extracellular DNA in single-and multiple-species unsaturated biofilms ». *Applied and Environmental Microbiology* 71 (9) : 5404–5410.
- Talbot, Nicholas J. 2009. *Annual Plant Reviews , Volume 11 , Plant-Pathogen Interactions*. Édité par Nicholas J Talbot. Wiley & Sons.
- Tavernier, S., et T. Coenye. 2015. « Quantification of *Pseudomonas aeruginosa* in multispecies biofilms using PMA-qPCR ». *PeerJ* 3 : e787.
- Taylor, A. F. S., et I. A. N. Alexander. 2005. « The ectomycorrhizal symbiosis : life in the real world ». *Mycologist* 19 (3) : 102–112.
- Taylor, D. L., et R. L. Sinsabaugh. 2015. « The Soil Fungi: Occurrence, Phylogeny, and Ecology ». Dans *Soil Microbiology, Ecology, and Biochemistry*, Édité par Elsevier Inc, 77–100.
- Taylor, M. J., R. H. Bentham et K. E. Ross. 2014. « Limitations of Using Propidium Monoazide with qPCR to Discriminate between Live and Dead *Legionella* in Biofilm Samples ». *Microbiology insights* 7 (7) : 15–24.
- Tedersoo, L., et al. 2014. « Disentangling global soil fungal diversity ». *Science* 346 (6213) : 1052–1053.
- Thomas, V. C., L. R. Thurlow, D. Boyle et L. E. Hancock. 2008. « Regulation of autolysis-dependent extracellular DNA release by *Enterococcus faecalis* extracellular proteases influences biofilm development ». *Journal of Bacteriology* 190 (16) : 5690–5698.
- Tian, J. H., A. M. Pourcher et P. Peu. 2016. « Isolation of bacterial strains able to metabolize lignin and lignin-related compounds ». *Letters in Applied Microbiology* 63 (1) : 30–37.
- Toljander, J. F., V. Artursson, L. R. Paul, J. K. Jansson et R. D. Finlay. 2006. « Attachment of different soil bacteria to arbuscular mycorrhizal fungal extraradical hyphae is determined by hyphal vitality and fungal species ». *FEMS Microbiology Ecology* 254 (1) : 34–40.
- Tran, C. S., et al. 2014. « The *Pseudomonas aeruginosa* Type III Translocon Is Required for Biofilm Formation at the Epithelial Barrier ». *PLoS Pathogens* 10 (11) : e1004479.
- Türetgen, I., E. Ilhan-Sungur et A. Cotuk. 2007. « Effects of short-time drying on biofilm-associated bacteria ». *Annals of Microbiology* 57 : 277–280.
- Uroz, S., M. Buée, C. Murat, P. Frey-Klett et F. Martin. 2010. « Pyrosequencing reveals a contrasted bacterial diversity between oak rhizosphere and surrounding soil ». *Environmental Microbiology Reports* 2 (2) : 281–288.
- Uroz, S., et J. Heinonsalo. 2008. « Degradation of N-acyl homoserine lactone quorum sensing signal molecules by forest root-associated fungi ». *FEMS Microbiology Ecology* 65 (2) : 271–278.

- Uroz, S., *et al.* 2007. « Effect of the mycorrhizosphere on the genotypic and metabolic diversity of the bacterial communities involved in mineral weathering in a forest soil ». *Applied and Environmental Microbiology* 73 (9) : 3019–3027.
- Uroz, S., *et al.* 2011. « Bacterial weathering and its contribution to nutrient cycling in temperate forest ecosystems ». *Research in Microbiology* 162 (9) : 821–831.
- Uroz, S., *et al.* 2013. « Functional Profiling and Distribution of the Forest Soil Bacterial Communities Along the Soil Mycorrhizosphere Continuum ». *Microbial Ecology* 66 (2) : 404–415.
- Valentini, M., *et al.* Filloux. 2016. « Biofilms and Cyclic di-GMP (c-di-GMP) Signaling: Lessons from *Pseudomonas aeruginosa* and Other Bacteria ». *The Journal of Biological Chemistry* 291 (24) : 12547–12555.
- Van Der Heijden, M. G. A., R. D. Bardgett *et* N. M. Van Straalen. 2008. « The unseen majority: Soil microbes as drivers of plant diversity and productivity in terrestrial ecosystems ». *Ecology Letters* 11 (3) : 296–310.
- Viollet, A., *et al.* 2011. « Fluorescent pseudomonads harboring type III secretion genes are enriched in the mycorrhizosphere of *Medicago truncatula* ». *FEMS Microbiology Ecology* 75 (3) : 457–67.
- Wang, B., *et al.* Y. L. Qiu. 2006. « Phylogenetic distribution and evolution of mycorrhizas in land plants ». *Mycorrhiza* 16 (5) : 299–363.
- Wang, S., *et al.* 2015. « The exopolysaccharide Psl-eDNA interaction enables the formation of a biofilm skeleton in *Pseudomonas aeruginosa* ». *Environmental Microbiology Reports* 7 (2) : 330–340.
- Wang, Y., H. Huang, A. Sun, Q. Zhang *et* D. Guo. 2011. « T3DB: an integrated database for bacterial type III secretion system ». 13 (1) : 66.
- Warmink, J. A., *et al.* J. D. Van Elsas. 2008. « Selection of bacterial populations in the mycosphere of *Laccaria proxima*: is type III secretion involved? ». *The ISME journal* 2 (8) : 887–900.
- Warmink, J. A., *et al.* J. D. Van Elsas. 2009. « Migratory response of soil bacteria to *Lyophyllum* sp. strain Karsten in soil microcosms ». *Applied and Environmental Microbiology* 75 (9) : 2820–2830.
- Webster, J., *et al.* R. W.S. Weber. 2007. *Introduction to Fungi*. Third. Édité par Cambridge university press.
- Weinert, N., *et al.* 2011. « PhyloChip hybridization uncovered an enormous bacterial diversity in the rhizosphere of different potato cultivars: Many common and few cultivar-dependent taxa ». *FEMS Microbiology Ecology* 75 (3) : 497–506.
- Wick, L. Y., *et al.* 2007. « Effect of fungal hyphae on the access of bacteria to phenanthrene in soil ». *Environmental Science and Technology* 41 (2) : 500–505.
- Wohlschlager, T., *et al.* 2014. « Methylated glycans as conserved targets of animal and fungal innate defense ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 111 (27) : 2787–2796.
- Xavier, L. J. C., *et al.* J. J. Germida. 2003. « Bacteria associated with *Glomus clarum* spores influence mycorrhizal activity ». *Soil Biology and Biochemistry* 35 (3) : 471–478.

- Xue, K., *et al.* 2016. « Tundra soil carbon is vulnerable to rapid microbial decomposition under climate warming ». *Nature Climate Change* 6 (6) : 595–600.
- Yang, P., M. Zhang, J. A. Warmink, M. Wang et J. D. Van Elsas. 2016. « The type three secretion system facilitates migration of *Burkholderia terrae* BS001 in the mycosphere of two soil-borne fungi ». *Biology and Fertility of Soils* 52 (7) : 1037–1046.
- Yonggang, K., et W. Pengfei. 2017. *3D DNA Nanostructure*. Édité par Springer protocols. Humana press.
- Zafra, O., M. Lamprecht-Grandio, C. G. De Figueras et J. E. Gonzalez-Pastor. 2012. « Extracellular DNA Release by Undomesticated *Bacillus subtilis* Is Regulated by Early Competence ». *PLoS ONE* 7 (11) : e48716.
- Zago, C. E., *et al.* 2015. « Dynamics of biofilm formation and the Interaction between *Candida albicans* and methicillin-susceptible (MSSA) and -resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) ». *PLoS ONE* 10 (4) : 1–15.
- Zhang, X., O. Zhuchenko, A. Kuspa et T. Soldati. 2016. « Social amoebae trap and kill bacteria by casting DNA nets ». *Nature communications* 7 : 10938.
- Zheng, W., E. K. Morris et M. C. Rillig. 2014. « Ectomycorrhizal fungi in association with *Pinus sylvestris* seedlings promote soil aggregation and soil water repellency ». *Soil Biology and Biochemistry* 78 : 326–331.
- Zhou, A. D., *et al.* 2014. « Profiling of differentially expressed genes in ectomycorrhizal fungus *Pisolithus tinctorius* responding to mycorrhiza helper *Brevibacillus reuszeri* MPt17 ». *Biologia* 69 (4) : 435–442.

Résumé

Dans les sols, les champignons ectomycorhiziens (ECM) forment une symbiose très répandue avec les racines des arbres et contribuent ainsi à leur croissance et à leur santé. Des études antérieures ont montré que certaines bactéries pouvaient influencer positivement la symbiose entre les ECM et les arbres, appelées BAM pour Bactéries Auxiliaires de la Mycorhization. Les mécanismes de l'effet auxiliaire des BAM sont encore peu connus. En amont de cette thèse, il avait été montré *in vitro* que la BAM *Pseudomonas fluorescens* BBc6 formait des structures similaires à des biofilms sur les hyphes de l'ECM *Laccaria bicolor*. Dans ce contexte, afin d'enrichir les connaissances concernant les interactions entre les ECM et les BAM, cette thèse a porté sur l'interaction physique entre ces deux organismes. L'étude a en partie été réalisée via une méthode d'analyse par microscopie confocale, développée durant cette thèse. Les résultats obtenus ont montré que cette bactérie formait des biofilms localisés préférentiellement sur la région apicale des colonies de l'ECM ce qui pourrait indiquer une interaction trophique. L'existence d'une telle interaction a d'ailleurs par la suite été confirmée. Les résultats ont également montré que l'interaction physique entre *L. bicolor* et BBc6 n'est pas spécifique puisque l'ensemble des treize autres souches bactériennes testées a formé des biofilms sur les hyphes de *L. bicolor*. En revanche, BBc6 s'est montrée incapable de former des biofilms sur certains champignons appartenant aux Ascomycètes, suggérant des mécanismes d'inhibition. De plus, l'étude de la matrice des biofilms formés par BBc6 a révélé la présence de réseaux de filaments constitués d'ADN qui semblent structurer ces biofilms et qui ont aussi été observés chez l'ensemble des souches bactériennes testées. Ces résultats révèlent un rôle structural de la molécule d'ADN qui, bien qu'il semble répandu, n'a que peu été reporté jusqu'à présent. Enfin, il a été montré que des mutants de BBc6 qui ont perdu leur effet auxiliaire forment des biofilms différents de la souche sauvage sur une surface abiotique suggérant un lien potentiel entre l'effet auxiliaire et la formation de biofilms.

Abstract

In soil ecosystems, ectomycorrhizal fungi (ECM) form a widespread symbiosis with roots of trees, contributing to tree growth and health. It has been shown that some bacteria, called mycorrhization helper bacteria (MHB), stimulate mycorrhizal symbiosis. The mechanisms of this helper effect are poorly understood. Previous studies have shown that the MHB *Pseudomonas fluorescens* BBc6 formed biofilm-like structures around the hyphae of the ECM *Laccaria bicolor* during their *in vitro* interaction. In this context, in order to increase knowledge concerning MHB / ECM interactions, the work presented here focuses on the physical interaction between these two organisms. To this purpose, a method of analysis based on confocal microscopy was developed. The results showed that the bacteria formed biofilms preferentially localized on the apical region of the ECM colonies, which could indicate a trophic interaction. Such an interaction has been subsequently confirmed. The results also showed that the physical interaction between *L. bicolor* and BBc6 is not specific since all thirteen other bacterial strains tested formed biofilms on the hyphae of *L. bicolor*. On the other hand, BBc6 was unable to form biofilms on some fungi belonging to Ascomycetes, suggesting the existence of inhibition mechanisms. Moreover, the study of the BBc6 biofilm matrix revealed networks of DNA-containing filaments which seem to structure these biofilms and which have also been observed in all the bacterial strains tested. These results reveal a structural role of the DNA molecule, a role that has been rarely reported so far despite its probable high occurrence. Finally, it has been shown that BBc6 mutants having lost their helper effect presented a modified phenotype concerning their biofilm formation on abiotic surface, suggesting a potential link between the helper effect and the biofilms formation.