



**Élucidation des mécanismes adaptatifs et métaboliques de *Bacillus subtilis* sur  
la plante et en présence d'espèces compétitrices**

Par

**VINCENT CHARRON-LAMOUREUX**

Thèse présentée au Département de biologie en vue  
de l'obtention du grade de docteur ès sciences (Ph.D.)

FACULTÉ DES SCIENCES  
UNIVERSITÉ DE SHERBROOKE

Sherbrooke, Québec, Canada, septembre 2023

Le 6 septembre 2023

*Le jury a accepté la thèse de Monsieur Vincent Charron-Lamoureux dans sa version finale.*

MEMBRES DU JURY

**Professeure Pascale B. Beauregard**

Directrice de recherche  
Département de biologie  
Université de Sherbrooke

**Dr Martin Fillion**

Évaluateur externe  
Centre de recherche et de développement  
de Saint-Jean-sur-Richelieu  
Agriculture et Agroalimentaire Canada

**Professeur Sébastien Roy**

Évaluateur interne  
Département de biologie  
Université de Sherbrooke

**Professeur Kamal Bouarab**

Président-rapporteur  
Département de biologie  
Université de Sherbrooke





## REMERCIEMENTS

J'aimerais tout d'abord remercier ma directrice de thèse, Pascale, qui m'a accueilli très tôt dans mon parcours universitaire, me donnant ainsi la chance d'intégrer le monde scientifique. J'aimerais aussi remercier les organismes subventionnaires qui ont permis de financer une grande partie de mes études graduées : Les Fonds de Recherche du Québec – Nature et Technologies (FRQNT), le centre SÈVE, Agrophytosciences, ainsi que MITACS. J'aimerais également remercier mes conseillers Sébastien Roy et Kamal Bouarab pour leurs conseils éclairés tout au long de mon parcours universitaire.

Merci aux membres du laboratoire de Pascale B. Beauregard passés et présents et aux membres du laboratoire de Jean-Philippe Bellenger pour leur collaboration. Je remercie sincèrement Matthew F. Traxler situé à l'Université de Berkeley, en Californie, ainsi les membres de son laboratoire, spécifiquement Mira et Luis, pour m'avoir accueilli chaleureusement dans leur laboratoire et avoir contribué à l'avancement de ma carrière scientifique.

J'aimerais sincèrement remercier les professeurs Jean-Philippe Bellenger, Claude Legault, Philippe Dauphin-Ducharme ainsi que Philippe Venne, Lounès Haroune et Olivier Savary pour avoir cru en mes idées de recherche et avoir accepté de collaborer. Sans eux, une grande partie de mon projet de doctorat n'aurait pas vue le jour. Merci!

Enfin, un immense merci à ma conjointe Maude et mes parents Christian et Lynda pour leur soutien morale et financier à travers toutes ces années.



## SOMMAIRE

La conception de modèles réductionnistes pour étudier les interactions entre les plantes et les microbes ainsi qu'entre les microbes eux-mêmes ont permis d'élucider une multitude de mécanismes moléculaires, choses quasi impossibles en conditions naturelles. Plusieurs espèces bactériennes ubiquitaires du sol ont été isolées et criblées en interaction simple pour leurs propriétés bénéfiques envers la plante. Malheureusement, bien qu'il existe une panoplie d'espèces bactériennes favorisant la croissance des plantes, les études portant sur les facteurs biotiques et abiotiques influençant l'efficacité de ces bactéries utilisées en agriculture biologique sont peu nombreuses et limitent nos capacités à optimiser leur utilisation.

Un des défis d'importance dans les prochaines années concerne la création de consortiums bactériens hautement efficaces dans l'objectif d'éliminer un large éventail d'agents pathogènes et de diminuer significativement l'usage de pesticides chimiques. *Bacillus* et *Pseudomonas* sont les bactéries les plus couramment utilisées comme biofertilisants. Malgré le potentiel de synergie entre ces deux genres bactériens pour la création d'un consortium, la plupart de leurs interactions en paire sont antagonistes. En effet, de nombreuses études ont rapporté des effets antagonistes entre ces dernières, ce qui entraîne une coexistence instable. De plus, une particularité qui distingue *Bacillus* de *Pseudomonas* est son habilité à former des endospores, des structures dormantes ultrarésistantes aux conditions environnementales adverses. En contrepartie, la sporulation peut limiter la capacité des espèces de *Bacillus* à protéger la plante en réduisant leur activité métabolique.

Au cours de mon projet, j'ai développé et mis en place un système de culture hydroponique avec la plante modèle *Arabidopsis thaliana* afin d'étudier la cinétique de l'état métabolique de *B. subtilis* après une inoculation sous forme de spores. Il s'est

avéré que ces spores germent simultanément avec la graine. Cependant, ces bactéries ne restent que brièvement dans l'état végétatif (métaboliquement actif) avant de retourner à l'état de dormance. Ensuite, j'ai conçu un système de culture hydroponique contenant un insert de culture cellulaire qui permet la séparation physique des partenaires d'interactions pour évaluer l'importance de la colonisation des plantules sur la modulation de l'état métabolique de *Bacillus*. Ce système a permis de montrer qu'*Arabidopsis thaliana* sécrète des molécules qui favorisent l'état de dormance de *B. subtilis*, uniquement lorsque ce dernier entre en contact avec la plante, et ce mécanisme n'est pas espèce-spécifique. En effet, le contact entre la plante et *P. fluorescens* mène également à la formation de spores chez *B. subtilis*. Aussi, nous avons montré que le site d'établissement préférentiel et de persistance des espèces de *Bacillus* appliquées de manière exogène sur des plantes ornementales se retrouve au niveau racinaire et non foliaire.

Dans le second volet de mon projet, je me suis intéressé à l'interaction entre *Bacillus* et *Pseudomonas*. J'ai d'abord procédé à des essais d'interactions de paires (côte à côte) sur milieu solide pour déterminer le type d'interaction entre *B. subtilis* et trois espèces de *Pseudomonas* qui possèdent un arsenal de métabolites secondaires différents. La compétition interspécifique entre *B. subtilis* et *P. protegens* a révélé l'implication de l'acide pulcherriminique (PA), une molécule liant le fer ferrique; Fe(III). En combinant des approches de microbiologie et de chimie analytique, j'ai montré deux nouveaux rôles de la PA dans un contexte de compétition microbienne : elle crée une réserve locale de Fe(III) favorisant sa récupération via la production de sidérophores et réduit le stress oxydatif en précipitant le Fe(III).

Ensemble, nos résultats participent à caractériser la formation de spores sur plantules, un facteur négligé jusqu'à maintenant dans l'efficacité des biofertilisants à base de *Bacillus*. De plus, nous avons découvert et caractérisé une nouvelle stratégie contre-intuitive sur la gestion du Fe(III) utilisé par *B. subtilis* dans un contexte de compétition microbienne.

## MOTS CLÉS

*Bacillus subtilis*, *Arabidopsis thaliana*, endospores, racines, compétition interspécifique, *Pseudomonas*, fer, pulcherrimine, sidérophores, stress oxydatif

# TABLE DES MATIÈRES

<b>Chapitre 1</b> .....	<b>1</b>
Introduction.....	1
<b>1.1 Le microbiote végétal</b> .....	<b>1</b>
1.1.1 La phyllosphère.....	2
1.1.2 La rhizosphère.....	2
1.1.3 Les exsudats racinaires.....	5
1.1.4 Le système immunitaire de la plante.....	6
<b>1.2 Les rhizobactéries favorisant la croissance des plantes</b> .....	<b>9</b>
<b>1.3 <i>Bacillus subtilis</i></b> .....	<b>11</b>
1.3.1 Général.....	11
1.3.2 La chimiotaxie.....	14
1.3.3 La formation de biofilm.....	14
1.3.4 La sporulation et la germination.....	18
1.3.5 L'influence de la plante sur la différenciation de <i>B. subtilis</i> .....	20
<b>1.4 Les espèces de <i>Pseudomonas</i></b> .....	<b>21</b>
1.4.1 Général.....	21
1.4.2 Métabolites secondaires.....	21
1.4.3 2,4-diacétylphloroglucinol (2,4-DAPG).....	22
1.4.4 La pyolutéorine.....	23
1.4.5 Le cyanure d'hydrogène.....	24
1.4.6 Le système de sécrétion de type 6 (T6SS).....	24
1.4.7 Interactions <i>Bacillus</i> – <i>Pseudomonas</i> .....	25
1.4.8 Limitation aux études d'interactions de paires.....	26
<b>1.5 L'importance du fer</b> .....	<b>27</b>
<b>1.6 La biodisponibilité du Fer</b> .....	<b>28</b>
<b>1.7 Les stratégies d'acquisition du Fe(III)</b> .....	<b>29</b>
1.7.1 Les sidérophores – métallophores.....	29
1.7.2 La relation entre l'oxygène et le Fe.....	32
1.7.3 Les effets du stress oxydatif chez <i>B. subtilis</i> .....	34
1.7.4 Les systèmes de protection du stress oxydatif chez <i>B. subtilis</i> .....	34
1.7.5 Le système d'acquisition du Fe chez <i>B. subtilis</i> NCIB 3610.....	37

1.7.6	Les sidérophores produits par les espèces de <i>Pseudomonas</i> .....	39
1.7.7	Les conséquences et avantages de la sécrétion des sidérophores dans le milieu environnant.....	40
1.7.8	Théories co-évolutives .....	41
1.7.9	Rôles des sidérophores dans l'établissement de la maladie.....	42
1.7.10	L'acide pulcherriminique .....	43
<b>1.8</b>	<b>La relation entre le Fe et le biofilm chez <i>B. subtilis</i> .....</b>	<b>46</b>
1.8.1	L'importance de l'acquisition du fer pour la formation d'un biofilm chez <i>B. subtilis</i> et vice versa.....	46
1.8.2	Les stratégies alternatives à l'utilisation des sidérophores – le transfert d'électron extracellulaire .....	47
<b>1.9</b>	<b>Hypothèses du projet de doctorat .....</b>	<b>48</b>
<b>1.10</b>	<b>Objectifs du projet de doctorat .....</b>	<b>49</b>
<b>Chapitre 2</b> .....		<b>51</b>
	<i>Arabidopsis thaliana</i> seedlings influence <i>Bacillus subtilis</i> spore formation .....	51
<b>2.1</b>	<b>Introduction.....</b>	<b>51</b>
2.1.1	Pertinence .....	51
2.1.2	Apport des auteurs .....	52
2.1.3	Référence.....	53
2.2	Article .....	54
2.2.1	Page titre .....	54
2.2.2	Abstract .....	54
2.2.3	Introduction.....	55
2.2.3	Results .....	57
2.3.3.1	<i>B. subtilis</i> sporulation dynamic over time.....	57
2.3.3.2	<i>GerK</i> receptor is responsible for an efficient germination of the spores. ....	60
2.3.3.3	<i>KinA</i> and <i>KinB</i> are essential genes for sporulation in contact with <i>A. thaliana</i> . ...	61
2.3.3.4	The presence of plants influences the sporulation of <i>B. subtilis</i> . ....	63
2.3.3.5	Direct contact between plants and bacteria is required to induce <i>B. subtilis</i> sporulation.....	66
2.3.3.6	<i>Bak1</i> is involved in the induction of the sporulation level of <i>B. subtilis</i> . ....	68
2.3.4	DISCUSSION .....	70
2.2.5	Materials and methods .....	72
2.2.5.1	Strains, media, and culture conditions. ....	72

2.2.5.2	Strain construction .....	73
2.2.5.3	Dynamic of germination and sporulation. ....	73
2.2.5.4	Spore quantification. ....	73
2.2.5.5	Spent medium and total carbon quantification.....	74
2.2.6	Acknowledgments .....	75
2.2.7	References .....	75
2.2.8	Supplementary data .....	79
2.2.8.1	References .....	82
<b>Chapitre 3</b>	.....	<b>84</b>
	<i>Bacillus subtilis</i> and <i>Bacillus velezensis</i> population dynamics and quantification of spores after inoculation on ornamental plants.....	84
<b>3.1</b>	<b>Introduction</b> .....	<b>84</b>
3.1.1	Pertinence .....	84
3.1.2	Apport des auteurs .....	85
3.1.3	Référence.....	86
<b>3.2</b>	<b>Article</b> .....	<b>87</b>
3.2.1	Page titre .....	87
3.2.2	Abstract .....	87
3.2.3	Résumé .....	88
3.2.4	Introduction.....	88
3.2.5	Methods.....	90
3.2.6	Results and discussion.....	91
3.2.7	Acknowledgments .....	100
3.2.8	Conflict of interest.....	100
3.2.9	References .....	101
<b>Chapitre 4</b>	.....	<b>104</b>
	Pulcherriminic acid modulates iron availability and protects against oxidative stress during microbial interactions .....	104
<b>4.1</b>	<b>Introduction</b> .....	<b>104</b>
4.1.1	Pertinence .....	104
4.1.2	Apport des auteurs .....	105
4.1.3	Référence.....	106
<b>4.2</b>	<b>Article</b> .....	<b>107</b>



4.2.1	Page titre .....	107
4.2.2	Abstract .....	108
4.2.3	Introduction.....	108
4.2.4	Results .....	110
4.2.4.1	<i>P. protegens</i> Pf-5 triggers pulcherriminic acid production in <i>B. subtilis</i> .....	110
4.2.4.2	<i>Pulcherrimin is important for the survival of B. subtilis in interspecies interaction</i> ..	114
4.2.4.3	<i>Pf-5 and pulcherrimin trigger P<sub>dhbA</sub>-lacZ expression, and Pf-5 presence increases Fe load in B. subtilis biofilm</i> .....	116
4.2.4.4	<i>Bacillibactin siderophore is key to mobilizing pulcherrimin-bound Fe</i> .....	119
4.2.4.6	<i>Immobilization of Fe(III) by PA prevents oxidative stress in the biofilm</i> .....	125
4.2.5	Discussion .....	128
4.2.6	Methods.....	131
4.2.6.1	<i>Strains and culture conditions</i> .....	131
4.2.6.2	<i>Strains construction</i> .....	131
4.2.6.3	<i>Pairwise interactions</i> .....	132
4.2.6.4	<i>Microscopy</i> .....	133
4.2.6.5	<i>Flow cytometry analysis</i> .....	133
4.2.6.6	<i>Iron quantification by ICP-MS</i> .....	133
4.2.6.7	<i>Pulcherrimin purification and PA synthesis</i> .....	134
4.2.6.8	<i>β-galactosidase assays</i> .....	135
4.2.6.9	<i>Pellicle formation and growth curves with pulcherrimin</i> .....	135
4.2.6.10	<i>In vitro dissociation kinetics assays using UPLC-MS/MS</i> .....	135
4.2.6.11	<i>Measurement of ROS levels</i> .....	136
4.2.6.12	<i>Cyclic voltammetry</i> .....	137
4.2.6.13	<i>Statistical analysis</i> .....	137
4.2.7	Data Availability .....	137
4.2.8	Acknowledgements .....	138
4.2.9	References .....	138
4.2.10	Supplementary data .....	144
4.2.7.1	<i>References</i> .....	166
<b>Chapitre 5.....</b>		<b>167</b>
Discussion et conclusion .....		167
5.1	<b>La formation d'endospores sur la plante .....</b>	<b>167</b>
5.1.1	<i>La plante tolère B. subtilis</i> .....	167

5.1.2	La plante possède une capacité limite de colonisation .....	169
<b>5.2</b>	<b>Les effets de la sécrétion de l'acide pulcherriminique .....</b>	<b>170</b>
5.2.1	Au-delà de sa fonction de chélateur de Fe(III) – l'acide pulcherriminique comme mécanisme de protection contre les ROS et des dommages à l'ADN .....	171
5.2.2	La pulcherrimine produite en réponse au cyanure d'hydrogène ? .....	172
5.2.3	La pulcherrimine créerait une réserve locale de Fe et agirait comme bien commun .	173
5.2.4	<i>B. subtilis</i> est-il le premier bénéficiaire des effets de la pulcherrimine dans un environnement complexe ? .....	175
5.2.5	Des rôles possibles à l'acide pulcherriminique indépendamment du Fe(III) .....	176
<b>5.3</b>	<b>Perspectives.....</b>	<b>177</b>
5.3.1	Étudier le comportement de <i>B. subtilis</i> dans un environnement plus représentatif des conditions naturelles.....	177
5.3.2	Déterminer les causes menant à la sécrétion de la PA.....	178
5.3.3	Évaluer les cinétiques de dissolution de la pulcherrimine en présence de sidérophores 179	
5.3.4	Les rôles de la pulcherrimine dans son environnement naturel, la rhizosphère .....	179
<b>5.4</b>	<b>Conclusion .....</b>	<b>181</b>
<b>Annexe 1</b>	<b>.....</b>	<b>182</b>
<b>A.1</b>	<b>Article en tant que co-auteur .....</b>	<b>182</b>
A.1.1	Référence .....	182
<b>A.2</b>	<b>Article .....</b>	<b>183</b>
A.2.1	Page titre .....	183
A.2.1	Abstract .....	183
A.2.2	Introduction.....	185
A.2.3	Results .....	188
A.2.3.1	<i>Pseudomonas spp. impede B. subtilis colonization on seedlings</i> .....	188
A.2.3.2	<i>B. subtilis evolves rapidly on tomato plant roots</i> .....	188
A.2.3.3	<i>Mutations in biofilm regulation genes are conserved amongst evolved isolates</i> ....	190
A.2.3.4	<i>Evolved isolates show enhances colonization in a plant-independent manner</i> .....	191
A.2.3.5	<i>Evolved isolates compete better with other Pseudomonas species on roots</i> .....	192
A.2.3.6	<i>Impacts of the SNPS on the biofilm regulators functionality</i> .....	192
A.2.4	Discussion .....	193
A.2.5	Materials and Methods .....	196
A.2.5.1	<i>Bacteria strains and culture conditions</i> .....	196
A.2.5.2	<i>Seedlings preparation</i> .....	196

A.2.5.3	<i>Strains constructions</i> .....	196
A.2.5.4	<i>Experimental evolution</i> .....	197
A.2.5.5	<i>Whole genome sequencing</i> .....	198
A.2.5.6	<i>Colonization assays</i> .....	198
A.2.5.7	<i>Microscopy</i> .....	199
A.2.5.8	<i>Statistical analysis</i> .....	200
A.2.5.9	<i>Acknowledgements</i> .....	200
A.2.6	References .....	209
A.2.7	Supplementary data .....	214
<b>Bibliographie .....</b>		<b>219</b>



## LISTE DES ABRÉVIATIONS

°C	Degré Celsius
2,3-DHB	Acide 2,3-dihydroxybenzoïque
2,4-DAPG	2,4-diacétylphloroglucinol
ABC	<i>ATP-Binding Cassette</i>
ADN	Acide désoxyribonucléique
BAK1	<i>BRI1-associated receptor kinase 1</i>
BB	Bacillibactine
BGCs	<i>Biosynthetic gene clusters</i>
CaDPA	Acide dipicolinique chélaté aux ions divalents Ca <sup>2+</sup>
CFU	<i>Colony-forming units</i>
CLEs	Enzymes lytiques du cortex
cm	<i>Centimeter</i>
CO <sub>2</sub>	Dioxyde de carbone
Co <sup>2+</sup>	Cobalt
Cu	Cuivre
DCFH <sub>2</sub> -DA	<i>2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate</i>
DFO	Déféroxamine
EDTA	Acide éthylènediaminetétraacétique
EET	<i>Extracellular electron transport</i>
EFR	<i>EF-Tu receptor</i>
EPS	Exopolysaccharides
ERM	Érythromycine
ETI	<i>Effector-Triggered Immunity</i>
FADH <sub>2</sub>	Flavine adénine dinucléotide
Fe	Fer
Fe(II)	Fer ferreux
Fe(III)	Fer ferrique
FLS2	<i>Flagellin-Sensitive 2</i>
Fur	<i>Ferric uptake regulator</i>
FusA	Facteur d'élongation G
g	Gramme

GRAS	<i>Generally Recognized as Safe</i>
h	Heure
H <sub>2</sub>	Hydrogène
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Peroxyde d'hydrogène
HR	<i>Hypersensitive response</i>
HCN	Cyanure d'hydrogène
GCMS	Chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse
ICP-MS	<i>Inductively coupled plasma mass spectrometry</i>
K <sup>+</sup>	Ion potassium
Kan	Kanamycine
KCl	Chlorure de potassium
Kpb	Kilo paires de bases
L	Litre
LB	<i>Lysogeny broth</i>
Leu	Leucine
<i>Log K</i>	<i>Binding constant</i>
M	Molaire
MAMP	Motif moléculaire associé aux microbes
min	Minute
mL	Millilitre
mm	Millimètre
mM	Millimolaire
Mn	Manganèse
MntR	<i>Manganese transport regulator</i>
MOPS	<i>3-(N-morpholino)propanesulfonic acid</i> (acide 3-morpholino-1-propanesulfonique)
Mpb	Million de paires de bases
MS	Murashige and Skoog
MSgg	<i>Minimal salts glycerol glutamate</i>
mV	<i>Millivolts</i>
N	Azote
NB-LRR	<i>Nucleotide Binding and Leucine Rich Repeat domains</i>
Ne	Néon
NaCl	Chlorure de sodium

NAD	Nicotinamide adénine dinucléotide (forme oxydée)
NADH	Nicotinamide adénine dinucléotide (forme réduite)
NRPS	<i>Non-ribosomal peptide synthetase</i> (Synthétase de peptides non ribosomiques)
O <sub>2</sub>	Dioxygène
O <sub>2</sub> <sup>-</sup>	Superoxyde
OD	<i>Optical density</i> (Densité optique)
ONPG	Ortho-nitrophényl-β-galactoside
PA	Acide pulcherriminique
PAMP	<i>Pathogen-associated molecular pattern</i>
PBS	<i>Phosphate-buffered saline</i> (Tampon phosphate salin)
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i> (Réaction en chaîne par polymérase)
PerR	<i>Peroxide regulator</i>
PGPR	<i>Plant-growth promoting rhizobacteria</i> (Rhizobactéries promouvant la croissance des plantes)
pH	Pouvoir hydrogène
PKS	<i>Polyketide synthetase</i> (Polycétide synthétase)
PRR	<i>Pattern-recognition receptors</i>
PTI	<i>Pattern-triggered immunity</i>
PYO	Pyoverdine
RCS	Espèces réactives du chlore
Redox	Oxydation-réduction
RiPPs	Peptides ribosomiques synthétisés et modifiés post-traductionnellement
RNS	Espèces réactives de l'azote
ROS	Espèces réactives de l'oxygène
RPM	<i>Revolutions per minute</i> (Révolutions par minute)
s	Seconde
SD	<i>Standard deviation</i>
SEM	<i>Standard error of the mean</i>
SERK1	<i>Somatic embryogenesis receptor-like kinase</i>
T	Temps
Tet	Tétracycline
TPEN	N,N,N',N'-Tetrakis(2-pyridylmethyl)ethylenediamine
T6SS	Système de secretion type 6

UHPLC	<i>Ultra-High Performance Liquid Chromatography</i> (Chromatographie liquide à ultra haute performance)
V	Volume
VOCs	<i>Volatiles organic compounds</i>
UFC	Unité formatrice de colonie
μL	Microlitre
μM	Micromolaire
WT	<i>Wild type</i> (Souche sauvage)
Ybt	Yersiniabactine
Yfp	<i>Yellow fluorescent protein</i> (Protéine fluorescente jaune)
Zn	Zinc
Zur	<i>Zinc uptake regulator</i>
•OH	Radical hydroxyde





# LISTE DES FIGURES

## CHAPITRE 1

### Introduction

<b>Figure 1.1.</b> La structure de la rhizosphère.....	<b>4</b>
<b>Figure 1.2.</b> Le système immunitaire de la plante selon le modèle « zigzag » et les rôles de BAK1.....	<b>8</b>
<b>Figure 1.3.</b> Les mécanismes d'action des agents de biocontrôle.....	<b>10</b>
<b>Figure 1.4.</b> Représentation des sphères d'études utilisant <i>B. subtilis</i> à titre de modèle.....	<b>13</b>
<b>Figure 1.5.</b> La formation du biofilm chez <i>B. subtilis</i> .....	<b>15</b>
<b>Figure 1.6.</b> Cascade de phospho-relais menant à différent stades de développement.....	<b>16</b>
<b>Figure 1.7.</b> Les classes de sidérophores.....	<b>31</b>
<b>Figure 1.8.</b> La réaction de Fenton et de Haber-Weiss.....	<b>33</b>
<b>Figure 1.9.</b> Voie de la synthèse des sidérophores 2,3-dihydroxybenzoate et bacillibactine chez <i>B. subtilis</i> .....	<b>38</b>
<b>Figure 1.10.</b> Stratégies de compétition pour l'acquisition du Fe(III) par les sidérophores dans les interactions sociales.....	<b>42</b>
<b>Figure 1.11.</b> Voie de synthèse de l'acide pulcherriminique et formation du complexe ferrique à l'extérieur de la cellule .....	<b>45</b>

## CHAPITRE 2

### ***Arabidopsis thaliana* seedlings influence *Bacillus subtilis* spore formation**

<b>Figure 2.1.</b> <i>Bacillus subtilis</i> sporulation dynamic on roots in a hydroponic culture over time.....	59
<b>Figure 2.2.</b> GerK receptor is responsible for an efficient germination of the spores.....	61
<b>Figure 2.3.</b> KinA and KinB are essential for spore formation in contact with <i>Arabidopsis thaliana</i> . ....	62
<b>Figure 2.4.</b> <i>Arabidopsis thaliana</i> Col-0 influences <i>Bacillus subtilis</i> sporulation.....	65
<b>Figure 2.5.</b> Direct contact between <i>Arabidopsis thaliana</i> and <i>Bacillus subtilis</i> is required to induce sporulation.....	67
<b>Figure 2.6.</b> Bak1 is involved in the induction of the sporulation level of <i>Bacillus subtilis</i> .....	69

### Matériel supplémentaire

<b>Figure S2.1.</b> The medium Murashige and Skoog had no impact on the sporulation level of <i>Bacillus subtilis</i> .....	80
<b>Figure S2.2.</b> <i>B. subtilis</i> sporulation dynamic on seedlings in soil.....	81
<b>Figure S2.3.</b> Inoculation of <i>B. subtilis</i> vegetative cells induces <i>A. thaliana</i> browning roots.....	82

CHAPITRE 3

***Bacillus subtilis* and *Bacillus velezensis* population dynamics and quantification of spores after inoculation on ornamental plants**

<b>Figure 3.1.</b>	Dynamics of population (CFU/g) and proportion of spores (%) of <i>B. subtilis</i> and <i>B. velezensis</i> on <i>E. purpurea</i> SR (gray circle), FA (dark-gray square) and <i>L. angustifolia</i> (black triangle) on leaves.....	93
<b>Figure 3.2.</b>	Dynamics of population (CFU/g) and proportion of spores (%) of <i>B. subtilis</i> and <i>B. velezensis</i> on <i>E. purpurea</i> SR (gray circle), FA (dark-gray square) and <i>L. angustifolia</i> (black triangle) in soil.....	95
<b>Figure 3.3.</b>	Dynamics of population (CFU/g) and proportion of spores (%) of <i>B. subtilis</i> and <i>B. velezensis</i> on <i>E. purpurea</i> SR (gray circle), FA (dark-gray square) and <i>L. angustifolia</i> (black triangle) on roots.....	98

## CHAPITRE 4

### **Pulcherriminic acid modulates iron availability and protects against oxidative stress during microbial interactions.**

<b>Figure 4.1.</b> <i>P. protegens</i> Pf-5 triggers pulcherriminic acid secretion in <i>B. subtilis</i> .....	112
<b>Figure 4.2.</b> Pulcherrimin is important for <i>B. subtilis</i> survival and biofilm formation.....	115
<b>Figure 4.3.</b> Pf-5 and pulcherrimin trigger bacillibactin synthesis and Pf-5 presence increases Fe load in <i>B. subtilis</i> biofilm.....	117
<b>Figure 4.4.</b> Bacillibactin siderophore is key to mobilizing pulcherrimin-bound Fe.....	121
<b>Figure 4.5.</b> Bacillibactin mobilizes pulcherrimin-bound Fe.....	124
<b>Figure 4.6.</b> Pulcherrimin prevents oxidative stress in biofilm by immobilizing Fe(III).....	126

## Matériel supplémentaire

<b>Figure S4.1.</b>	The <i>P. protegens</i> Pf-5 triggers the production of a red pigment in <i>B. subtilis</i> which is pulcherriminic acid.....	156
<b>Figure S4.2.</b>	Fluorescent microscopy of <i>B. subtilis</i> in interspecies competition with WCS365, WCS358, Pf-5, and purified DAPG.....	158
<b>Figure S4.3.</b>	Intracellular Fe concentration of WT and $\Delta yvmC$ with and without Pf-5.....	159
<b>Figure S4.4.</b>	Pulcherrimin and Pf-5 induce $P_{dhbA-lacZ}$ expression in <i>B. subtilis</i> .....	160
<b>Figure S4.5.</b>	<i>B. subtilis</i> $\Delta dhbA-F$ does not grow in presence of pulcherrimin.....	161
<b>Figure S4.6.</b>	Chemical structures of the molecules used throughout this study.....	162
<b>Figure S4.7.</b>	The apo-PA and pulcherrimin remain stable over time in aqueous solution.....	163
<b>Figure S4.8.</b>	Deferoxamine efficiently reduces intracellular oxidative stress compared to the metal chelator TPEN.....	164
<b>Figure S4.9.</b>	Cyclic voltammetry profile curves of Fe-free chelators .....	165

ANNEXE 1

**Adaptative Laboratory Evolution reveals biofilm regulating genes as key players in *B. subtilis* root colonization**

<b>Figure A1.</b> <i>B. subtilis</i> colonization is decreased by <i>Pseudomonas</i> species.....	198
<b>Figure A2.</b> Evolution of <i>B. subtilis</i> on tomato roots.....	199
<b>Figure A3.</b> Tomato root colonization by evolved isolates.....	200
<b>Figure A4.</b> <i>A. thaliana</i> root colonization by evolved isolates.....	201
<b>Figure A5.</b> Mutations in biofilm regulators confer fitness toward various <i>Pseudomonas</i> spp.....	202
<b>Figure A6.</b> Deletion of biofilm regulator gene <i>ywcC</i> improve tomato root colonization.....	202

Matériel supplémentaire

<b>Figure SA1.</b> Morphotypes of deletion mutants and evolved isolates...	217
--	-----

# LISTE DES TABLEAUX

## CHAPITRE 2

### ***Arabidopsis thaliana* seedlings influence *Bacillus subtilis* spore formation**

<b>Table S2.1 All strains used in this study.....</b>	<b>79</b>
---	-----------

## CHAPITRE 4

### **Pulcherriminic acid modulates iron availability and protects against oxidative stress during microbial interactions**

<b>Table S4.1 Strains used in this study.....</b>	<b>154</b>
<b>Table S4.2 Regression parameters.....</b>	<b>155</b>
<b>Table S4.3 Limit of quantification.....</b>	<b>155</b>

## ANNEXE 1

### **Adaptive Laboratory Evolution reveals biofilm regulating genes as key players in *B. subtilis* root colonization**

<b>Table A1 SNPs identified in the genomes of isolates evolved alone (BRE) on tomato roots.....</b>	<b>200</b>
<b>Table A2 SNPs identified in the genomes of isolates evolved with <i>P. fluorescens</i> (BRPE) on tomato roots.....</b>	<b>201</b>
<b>Table SA1 Mutations identified in the genomes of isolates from the BRE on tomato roots.....</b>	<b>214</b>
<b>Table SA2 Mutations identified in the genomes of isolates from the BRPE on tomato roots.....</b>	<b>215</b>



**Table SA3 Strains used in this study..... 216**



# CHAPITRE 1

## INTRODUCTION

### 1.1 Le microbiote végétal

La plante procure à ses habitants microscopiques une multitude de micro-environnements pouvant être habités et exploités. Elle abrite une grande diversité de microorganismes incluant des bactéries, des champignons, des protistes, des virus et des nématodes, ce qui constitue le microbiote végétal (Turner et al., 2013). Le microbiote est composé de microorganismes bénéfiques et neutres (Compant et al., 2019). Leur association avec la plante peut aider la croissance de cette dernière, à favoriser l'acquisition de nutriments et à protéger contre les agents pathogènes (Hacquard et al., 2015). L'assemblage de ces microorganismes sur la plante n'est pas stochastique et est structuré en fonction des interactions entre eux, avec leur hôte et l'environnement.

Chez la plante, le microbiote se divise en différentes parties : le microbiote de la phyllosphère, qui se trouve sur les parties aériennes telles que les tiges, les feuilles et les fruits, le microbiote racinaire situé au niveau des racines et celui de l'endosphère, qui représente la partie interne des tissus et des cellules (Hardoim et al., 2015; Reinhold-Hurek et al., 2015; Vorholt, 2012). La composition des communautés bactériennes est similaire entre la rhizosphère (la zone entourant les racines) et le sol éloigné (*bulk soil*), ce qui suggère l'importance de la racine dans l'assemblage microbien de la rhizosphère (Trivedi et al., 2020). Cependant, les communautés diffèrent significativement entre la rhizosphère, l'endosphère et la phyllosphère. Les propriétés physico-chimiques de ces différentes parties de la plante peuvent expliquer en partie ces différences dans la composition bactérienne.

### 1.1.1 La phyllosphère

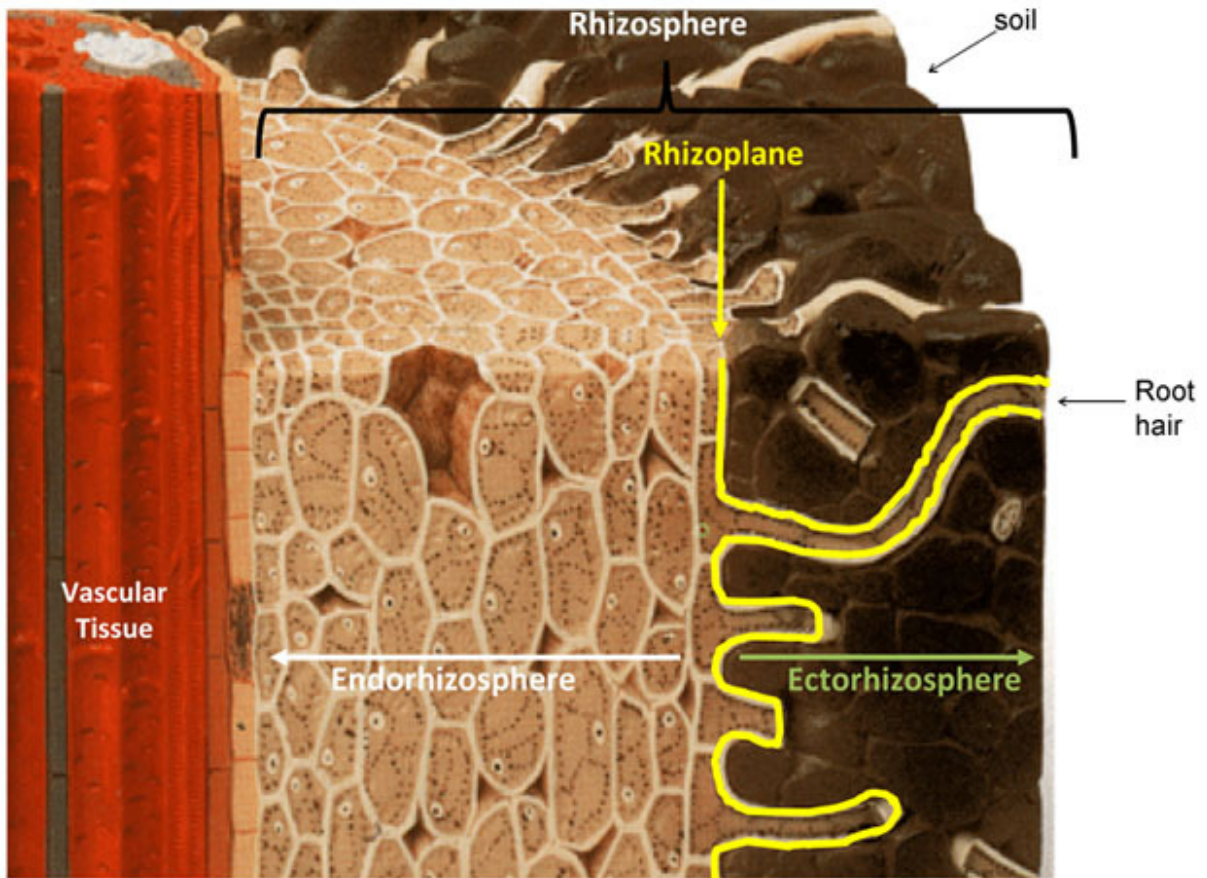
La phyllosphère est un environnement caractérisé par une oligotrophie, c.-à-d., une faible disponibilité de nutriments (Bashir et al., 2022). En plus de cette limitation, les microbes épiphytes résidant sur les parties aériennes des plantes sont soumis à des stress abiotiques spécifiques, tels que les fluctuations de température et les radiations UV induites par le cycle diurne, ainsi que les effets métaboliques des plantes (Lindow et Brandl., 2003; Vorholt, 2012). Les précipitations représentent également un facteur important pour ces résidents, car elles peuvent les lessiver de la surface des feuilles (Lindemann et Upper, 1985).

Les microbes endophytes évitent une partie des stress subis par les microbes épiphytes en pénétrant les tissus et en accédant à l'espace apoplastique; l'espace intercellulaire des plantes (Dora et al., 2022). Cependant, cette étape peut rapidement déclencher la réponse de défense de la plante. Par conséquent, les agents phytopathogènes qui envahissent les tissus végétaux, tels que *Pseudomonas syringae*, injectent des effecteurs dans le cytoplasme, manipulant l'hôte pour prévenir le déclenchement de son système immunitaire et favoriser leur propre développement (Farvardin et al., 2020; Hu et al., 2022; Roussin-Léveillé et al., 2022). Dans l'ensemble, les microbes de la phyllosphère doivent faire face à de nombreux stress pour survivre.

### 1.1.2 La rhizosphère

La rhizosphère, terme utilisé en 1904 par l'allemand Lorenz Hiltner, est définie comme la portion du sol sous l'influence des racines de plante, via la sécrétion d'exsudats racinaires, ce qui vient moduler la population microbienne habitant cette dernière ainsi que la disponibilité des nutriments (Hartmann et al., 2008; Hiltner, 1904). La définition de la rhizosphère a évolué au fil du temps et inclus désormais trois zones distinctes

dépendantes de la distance physique de la racine et de son influence. L'endorhizosphère, la zone la plus attenante de la racine, est composée du cortex et de l'endoderme où les microbes vivent entre les cellules (Figure 1.1.). Le rhizoplan est la zone médiale adjacente à l'épiderme racinaire et inclut le mucilage. La zone la plus éloignée de la racine est l'ectorhizosphère, qui s'étend jusqu'au sol, la partie qui n'est pas pénétrée par les racines, mais qui est influencée par la diffusion des exsudats (McNear, 2013). À l'opposé de la phyllosphère, les résidents de la rhizosphère sont moins exposés aux effets du cycle diurne, mais ils doivent s'adapter aux propriétés physico-chimiques du sol.



**Figure 1.1. La structure de la rhizosphère.**

La rhizosphère est divisée en 4 zones distinctes : l'endorhizosphère, l'ectorhizosphère et la rhizoplan. Tirée de (McNear, 2013).

Les habitants microbiens de la plante jouent des rôles importants dans la promotion de la croissance et la productivité. Dû à la relation complexe entre ces derniers, il a été proposé que l'hôte et son microbiote soient définis comme l'holobionte, c.-à-d., qu'ils sont considérés comme une seule entité et que l'évolution sélective entre la plante et son microbiote participe à la stabilité globale du système (Vandenkoornhuysen et al., 2015). Le microbiote de la plante renferme donc un potentiel fonctionnel intéressant pouvant être exploité et optimisé. Par exemple, les mécanismes des bactéries promotrices de la croissance des plantes (*Plant growth-promoting rhizobacteria*;

PGPR) sont étudiés pour leurs effets directs et indirects (Kloepper et al., 1980; Kloepper & Schroth, 1981). Ces mécanismes incluent la production de phytohormones, d'antibiotiques, l'élicitation de la résistance systémique induite, la solubilisation de nutriments et la fixation d'azote (Backer et al., 2018; Barazani & Friedman, 1999; Burris, 1974; Pieterse et al., 2014).

### 1.1.3 Les exsudats racinaires

Les plantes investissent de 20 à 40% du carbone fixé par la photosynthèse à la sécrétion d'exsudats racinaires pour créer un environnement riche en nutriments qui joue un rôle important dans sa communication avec les microbes qui y habitent (Badri et Vivanco, 2009). Les exsudats racinaires sont divisés en deux classes : les composés primaires (sucres, acides aminés et acides organiques) et les composés secondaires (coumarines, terpénoïdes, composés phénoliques) (Canarini et al., 2019). Selon leur abondance, ces molécules peuvent influencer la dynamique du recrutement des microorganismes du sol, les interactions plantes – microbes, la compétition interspécifique et la solubilisation de nutriments (Haichar et al., 2008). Le relargage de glucose, de sucrose et d'acides aminés favorise la colonisation des bactéries, qui perçoivent ces composés et se dirigent vers les racines grâce au processus de chimiotaxie (Allard-Massicotte et al., 2016; Feng et al., 2021; Tian et al., 2021). D'autres composés issus du métabolisme secondaire, comme les molécules antimicrobiennes et les toxines, modulent la population bactérienne et peuvent inhiber la croissance d'agents phytopathogènes spécifiques (Pang et al., 2021; Wink, 1988).

De manière intéressante, les plantes ont développé une stratégie appelée « *a cry for help* » (Rizaludin et al., 2021; Waqas et al., 2023). Cette stratégie, médiée par les exsudats racinaires, favorise le recrutement de microorganismes bénéfiques pour lutter contre un stress perçu. Par exemple, lorsque *A. thaliana* est infecté par l'agent pathogène *P. syringae*, les plantes sécrètent une plus grande quantité d'acide malique

qui attire *B. subtilis* au niveau de sa racine et aide la plante à se défendre (Rudrappa et al., 2008).

#### 1.1.4 Le système immunitaire de la plante

Les interactions entre les microbes de la rhizosphère et la plante impliquent inévitablement le système immunitaire de cette dernière. Le système immunitaire des plantes est représenté en 4 phases selon un modèle « zigzag » (Figure 1.2a) (Jones & Dangl, 2006). La phase 1 est la détection des MAMPs/ PAMPs (*Microbes/pathogens-associated molecular patterns*) qui permet l'activation du PTI (*PAMP-Triggered Immunity*) et d'inhiber la colonisation de l'agent pathogène, par exemple, en fermant les stomates qui sont nécessaires à l'entrée de certains agents pathogènes dans l'espace apoplastique (Zipfel, 2008). Un domaine conservé de 22 acides aminés de la flagelline, considéré comme PAMP, est suffisant pour induire une cascade de signalisation par sa liaison au récepteur FLS2 (*Flagellin-Sensitive 2*). FLS2 est aussi accompagné de son co-récepteur BAK1 (*BRI1-associated receptor kinase 1*), nécessaire à la transduction du signal suivant la détection de la flagelline. Aussi, BAK1 est impliqué dans le développement et dans les systèmes de défense liés à la mort cellulaire programmée (Figure 1.2b) (Chinchilla et al., 2007; Heese et al., 2007).

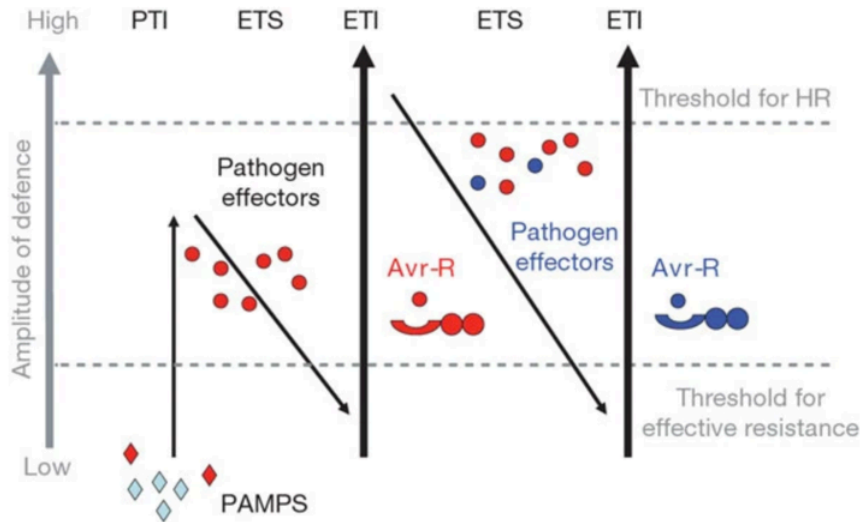
La phase 2 se déclenche en fonction du succès de l'agent pathogène. Ce dernier va alors relâcher des effecteurs qui vont accentuer sa virulence et peut interférer en continu avec le PTI pour éviter sa détection. Ensuite, la phase 3 consiste en la détection des effecteurs via les protéines NB-LRR (*Nucleotide Binding (NB) and Leucine Rich Repeat (LRR) domains*) de la plante, qui mène à l'activation du ETI (*Effector-Triggered Immunity*). La phase 4 est la suppression de l'ETI, soit par la diversification des effecteurs, leur perte ou en acquérant d'autres effecteurs par transfert horizontal de gène. Ainsi, il existe une interaction complexe entre la plante et les agents pathogènes qui est constamment en évolution. À noter qu'il s'agit d'un modèle généraliste car



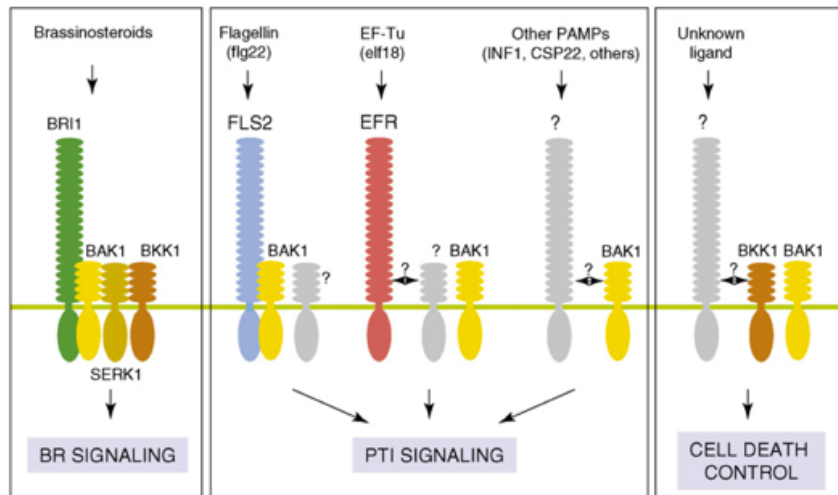
plusieurs pathosystèmes ne fonctionnent pas ainsi, notamment au niveau de certains agents pathogènes bactériens.

Les microorganismes bénéfiques doivent-ils déjouer le système immunitaire de manière continue pour éviter leur détection et leur élimination? Malgré que les agents pathogènes et les bactéries bénéfiques ont des motifs moléculaires reconnus par les plantes, certains agents pathogènes spécifiques induisent une réponse immunitaire qui serait indépendante des MAMPs et dépendante de la présence de toxines (David Thoms et al., 2023). Aussi, certaines bactéries bénéfiques masquent leur flagelline en produisant des molécules qui lient cette dernière. Par exemple, pour favoriser son établissement sur la racine, *B. subtilis* possède des traits adaptatifs lui permettant d'échapper au système immunitaire de son hôte. En effet, elle produit la subtilomycine, une molécule antibiotique liant la flagelline, réduisant ainsi les réponses immunitaires de la plante induite par le fragment flg22, un MAMP (Deng et al., 2019). Par conséquent, *B. subtilis* déjoue les systèmes de défense de la plante et passe inaperçue.

a



b



**Figure 1.2. Le système immunitaire de la plante selon le modèle « zigzag » et les rôles de BAK1.**

(a) Cette illustration démontre l'amplitude de défense ou de susceptibilité [PTI – ETS + ETI]. Dans la phase 1, les plantes détectent les motifs PAMPs et MAMPs, (diamants rouges) par les PRR (*Pattern-recognition receptors*) pour déclencher le PTI. En phase 2, l'agent pathogène ayant

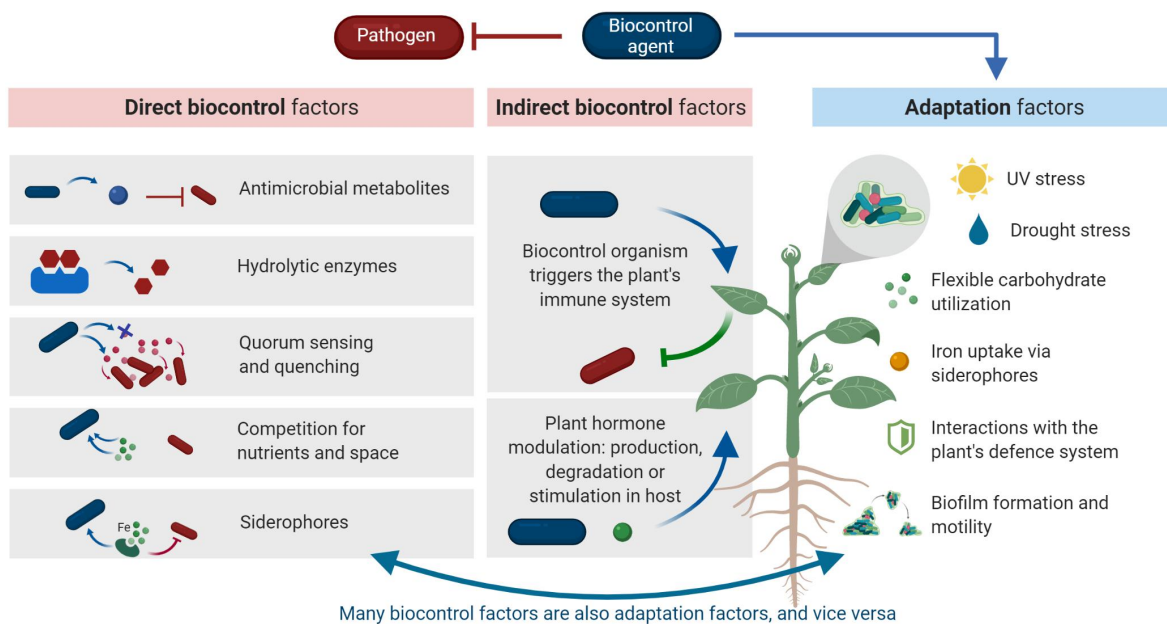
évitée sa détection, injecte des effecteurs qui interfèrent avec le PTI, permettant l'acquisition de nutriments et induisant le ETS. La phase 3, l'effecteur (cercle rouge) est reconnu par le récepteur NB-LRR, activant le ETI, qui dépasse un certain seuil activant l'hypersensibilité associée à la mort cellulaire (HR). Pour la phase 4, certains agents pathogènes sont sélectionnés dû à la perte de l'effecteur (rouge) et peuvent potentiellement acquérir de nouveaux effecteurs, supprimant à nouveau le ETI. La sélection est aussi possible chez la plante en développement de nouveaux allèles NB-LRR qui vont reconnaître les nouveaux effecteurs de l'agent pathogène. **(b)** BAK1/SERK1 (SOMATIC EMBRYOGENESIS RECEPTOR-LIKE KINASE) interagit avec BRI1 et est un régulateur positif des brassinostéroïdes chez *A. thaliana*. Le récepteur FLS2 et EFR (*EF-Tu receptor*) requièrent aussi BAK1/SERK1 pour l'activation efficace du PTI et BAK1 est aussi impliqué dans la détection de d'autres PAMPs. BAK1 est aussi impliqué dans le contrôle de la mort cellulaire. Tirée de (Jones & Dangl. 2006) et (Zipfel. 2008).

## 1.2 Les rhizobactéries favorisant la croissance des plantes

Les PGPR, ces bactéries résidentes de la rhizosphère, possèdent des attributs permettant d'influencer positivement la croissance et la productivité des plantes, ainsi que de lutter contre les agents phytopathogènes, de manière directe ou indirecte (Figure 1.3) (Legein et al., 2020). Les mécanismes catégorisés comme étant directs comprennent la sécrétion de métabolites aux propriétés antimicrobiennes capables d'inhiber ou de retarder la croissance d'agents pathogènes. D'autres produisent des enzymes hydrolytiques (p. ex., des chitinases, protéases) qui aident à combattre des champignons phytopathogènes (Schönbichler et al., 2020). La compétition bactérienne pour la niche peut prévenir l'établissement de bactéries néfastes. Enfin, plusieurs microorganismes produisent des sidérophores qui vont lier le Fe(III) et ainsi prévenir son acquisition, privant ceux qui ne possèdent pas de sidérophores ou de récepteurs

aux xénosidérophores de ce micronutriment essentiel. Les mécanismes indirects, contrairement aux mécanismes directs, influencent l'état physiologique de la plante par l'élicitation de la réponse systémique induite, plongeant ainsi la plante dans un état d'alerte. Cet état d'alerte permet à la plante de mieux se protéger contre une infection en stimulant son système immunitaire sans compromettre sa croissance.

D'autres PGPR, agissant comme biofertilisants, sécrètent des composés modulant les niveaux hormonaux de la plante. Ces changements physiologiques permettent à la plante à mieux résister contre des stress biotiques et abiotiques et d'augmenter sa croissance.



**Figure 1.3. Les mécanismes d'action des agents de biocontrôle.**

Les bactéries agissant comme agents de biocontrôle efficaces possèdent plusieurs caractéristiques importantes. D'un côté, les bactéries doivent avoir des mécanismes de compétition directs, décrits dans la section de gauche de l'illustration. Au centre sont illustrés les effets indirects qui aident la plante à se défendre contre une invasion d'un agent pathogène.

Enfin, les agents de biocontrôle doivent être adaptés pour résister à différents stress environnementaux (côté droit de l'illustration). Tirée de (Legein *et al.*, 2020).

Dans l'effort collectif de diminuer l'application de pesticides chimiques en agriculture, qui sont néfastes pour les écosystèmes, la santé humaine et animale, les PGPR pourraient faire partie de la solution. Ces bactéries incluent plusieurs genres bactériens dont *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Variovarax*, *Klebsiella*, *Azosprillum* et *Enterobacter* (Bhattacharyya & Jha, 2012).

L'application de ces bactéries en agriculture biologique semble, *a priori*, une alternative prometteuse aux produits chimiques. Toutefois, leur efficacité en tant qu'agents de biocontrôle dépend de leur capacité à survivre et persister en sol, leur compatibilité avec leur hôte et leur habilité à compétitionner avec les microbes endogènes des plantes pour établir leur niche écologique. Basé sur ces facteurs, le genre *Bacillus* se démarque particulièrement par ses propriétés physiologiques. En effet, les *Bacillus* sont capables de se différencier en endospores, une structure physique caractérisée par un état de dormance (métabolisme inactif) et extrêmement résistante aux conditions environnementales adverses, ce qui favorise sa persistance (Tsotetsi *et al.*, 2022). De plus, cette caractéristique est attrayante pour les entreprises qui développent des biofertilisants puisque la formation d'endospores permet une formulation stable du produit qui peut être entreposé durant plusieurs années.

### **1.3 *Bacillus subtilis***

#### 1.3.1 Général

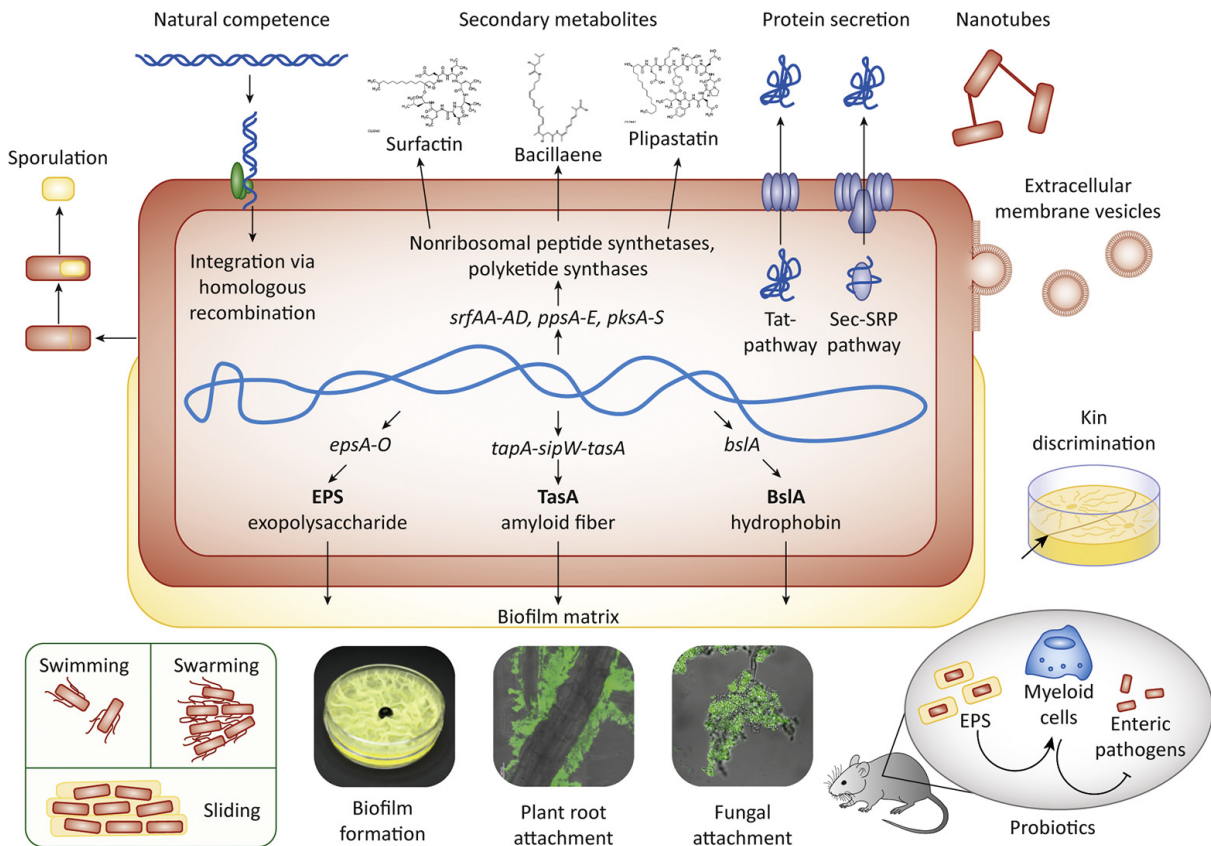
*Bacillus subtilis* NCIB 3610 est une bactérie GRAS (*Generally Recognized As Safe*) à Gram positif, ubiquitaire du sol et principalement retrouvée en association avec les

racines de plante. Son génome est entièrement séquencé et son chromosome est d'une longueur d'environ 4.2 Mpb et il porte généralement un plasmide de 84 kpb (pBS32). Son contenu en G+C est de ~43% et contient ~4500 gènes (Nye et al., 2017). Cet organisme est également attrayant puisqu'il est aisé à manipuler génétiquement ; Koo et al. ont d'ailleurs construit en 2017 une collection dans laquelle tous les gènes non essentiels ont été délétés (Koo et al., 2017).

*B. subtilis* est reconnue comme PGPR et possède des traits fonctionnels avantageux pour le développement et la protection des espèces végétales grâce à une pléthore de mécanismes de compétition. Cette bactérie produit un vaste éventail de métabolites bioactifs aux propriétés antibactériennes et antifongiques, incluant entre autres, la surfactine, la plipastatine et la bacillaene (Figure 1.4.) (Müller et al., 2014; Thérien et al., 2020; Tsuge et al., 1999). *B. subtilis* sécrète également des protéases capables de dégrader la paroi cellulaire de certains champignons phytopathogènes (Schönbichler et al., 2020). Ces molécules sont connues pour moduler le microbiote racinaire et préviennent les maladies en activant la résistance systémique induite (Ongena et al., 2007). Également, *B. subtilis* produit des cytokines et des phytohormones favorisant la croissance des plantes. Certaines espèces de *Bacillus* relâchent aussi des composés organiques volatils (VOCs ;2,3-butanediol) qui viennent influencer la croissance des plantes via la voie de signalisation des cytokinines (Ryu et al., 2003). *B. subtilis* est aussi capable d'interférer avec le *quorum sensing* des bactéries à Gram-négatif en produisant des lactonases responsables de la dégradation des N-acyl-homosérine lactones, importantes pour la production de facteurs de virulence des agents pathogènes (Rosier et al., 2021).

*B. subtilis*, grâce à ses nombreux facteurs d'adaptations, colonise efficacement plusieurs espèces de plantes. Sa versatilité métabolique lui permet d'utiliser une grande variété de sources de carbone et donc de compétitionner avec les autres bactéries au niveau des racines. La relation étroite qui existe entre *B. subtilis* et les

racines découle de ses capacités à coloniser la plante, s'attacher fermement à la racine et à persister malgré l'émergence de conditions environnementales défavorables.



**Figure 1.4. Représentation des sphères d'études utilisant *B. subtilis* à titre de modèle.**

*B. subtilis* est un organisme modèle pour l'étude de la motilité, de la formation d'un biofilm, de la sporulation, de la compétence naturelle, de la production de métabolites secondaires, de la sécrétion de protéines, de la formation des nanotubes, de la production des vésicules extracellulaires, de la discrimination des paires, de ses effets probiotiques, des interactions hôte – bactéries, champignons – bactéries et des bactéries – bactéries. Tirée de (Kovács, 2019).

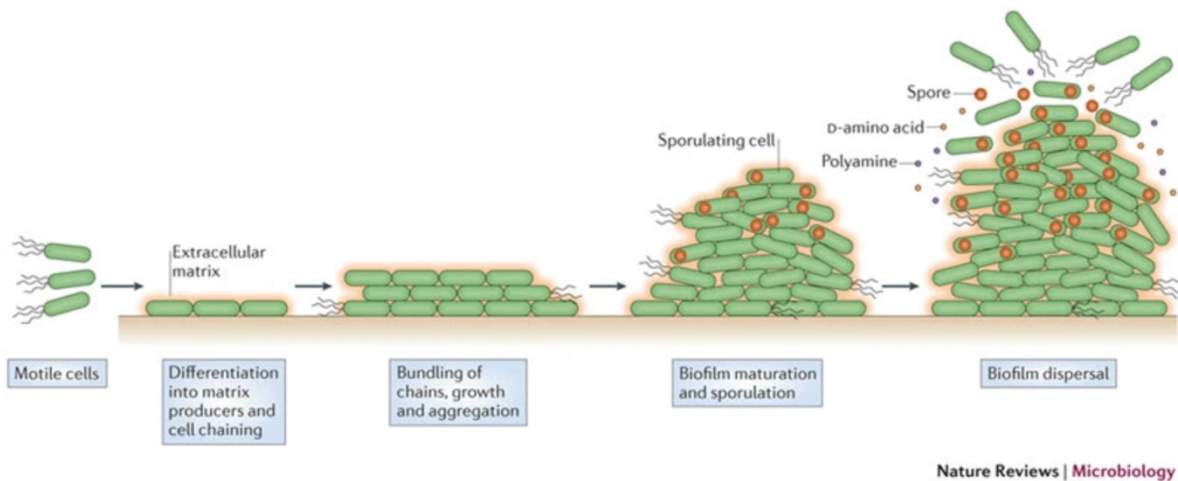
### 1.3.2 La chimiotaxie

Dans son mode de vie planctonique, *B. subtilis* forme des cellules planctoniques capables de se déplacer, soit aléatoirement, ou encore dirigées par chimiotaxie. En effet, la chimiotaxie est un processus par lequel un organisme motile est attiré ou répulsé par des composés extracellulaires. *B. subtilis* NCIB 3610 possède 10 récepteurs spécifiques (McpA, McpB, McpC, YvaQ, YoaH, YfmS, HemAT, TlpA, TlpB et TlpC) à la surface de sa membrane plasmique, impliqués dans la détection de molécules et qui dirigent les mouvements de la bactérie selon un gradient de concentration de molécules (Allard-Massicotte et al., 2016). Parmi ces récepteurs, seuls McpB, McpC et TlpC répondent à la présence d'exsudats racinaires via la détection d'acides aminés et de sucres. Aussi, le récepteur McpA réagirait à un composé qui induit une répulsion de la bactérie (nageant à l'opposé du gradient), suggérant que la plante pourrait réduire le niveau de colonisation de *B. subtilis* en éloignant une partie de la population. La chimiotaxie est nécessaire pour éliciter la réponse systémique induite, qui elle est requise pour combattre une infection à *P. syringae*, un agent phytopathogène (Allard-Massicotte et al., 2016).

### 1.3.3 La formation de biofilm

Le biofilm est un mode de vie collectif prévalant pour les organismes unicellulaires dans l'environnement. Il est estimé que 80% des bactéries et des archées sont retrouvés dans ce mode de vie dans l'environnement (Flemming et al., 2016). Le biofilm est un environnement très hétérogène abritant des cellules aux fonctions multiples qui participent à la survie et à la pérennité de la communauté (Yannarell et al., 2022). Il confère plusieurs avantages à cette dernière dont l'augmentation de tolérance aux stress biotiques et abiotiques (Mah & O'Toole, 2001; Sharma et al., 2019). Les mécanismes moléculaires impliqués dans la formation du biofilm chez *B. subtilis* sont étudiés depuis près de 20 ans (Figure 1.5.).



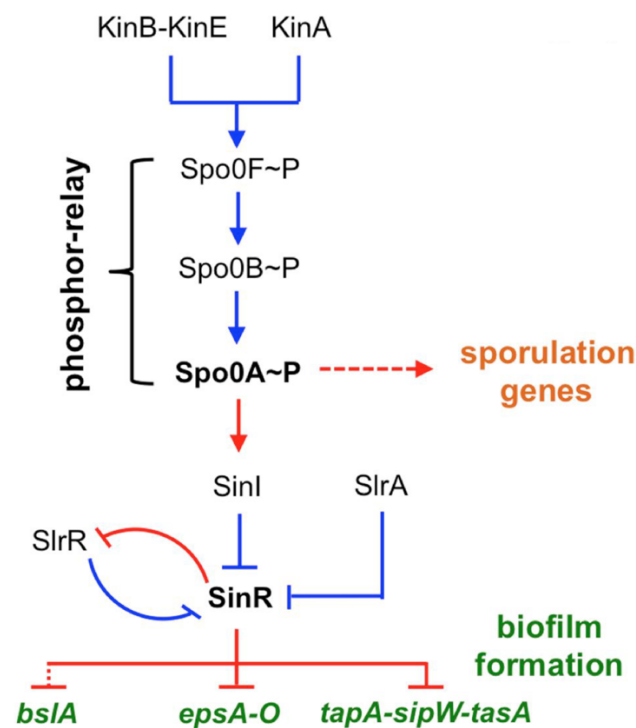


**Figure 1.5. La formation du biofilm chez *B. subtilis*.**

Le cycle de vie du biofilm de *B. subtilis* est divisé en plusieurs stades. Les cellules motiles vont se différencier en cellules non motiles, former des chainettes et produire de la matrice extracellulaire. Le biofilm mature, puis les cellules vont se différencier en endospores. La formation des spores requiert une haute concentration d'acide dipicolinique intracellulaire qui complexe le calcium, causant un influx important de calcium normalement attaché à la matrice, ce qui favorise la dispersion des cellules du biofilm Tirée de (Nishikawa Masaki & Kobayashi Kazuo, 2021; Vlamakis et al., 2013).

La différenciation des cellules planctoniques en cellules productrices de matrice extracellulaire est régulée par différents stimuli externes et internes. Chez *B. subtilis*, le régulateur principal de l'activation des gènes responsables de la formation du biofilm est Spo0A (Hamon & Lazazzera, 2001; Kearns et al., 2005). En amont de Spo0A se retrouvent les protéines membranaires et cytoplasmiques (histidines kinases) KinA, KinB, KinC, KinD et KinE, qui perçoivent les stimuli, s'autophosphorylent et engendrent une cascade de phosphorylation vers Spo0A (Figure 1.6.) (Higgins & Dworkin, 2012).

Ils phosphorylent la protéine Spo0F et Spo0F~P phosphoryle Spo0B qui phosphorylera Spo0A, et c'est le taux de Spo0A phosphorylé (Spo0A~P) qui dirige la différenciation cellulaire (Appleby et al., 1996; Lopez et al., 2009). À faible concentration de Spo0A~P dans la cellule, les bactéries sont motiles. Lorsque Spo0A~P atteint un niveau intermédiaire, l'expression des gènes responsables de la motilité est réprimée et celle des gènes requis pour la formation du biofilm est activé. Suivant l'atteinte d'un haut niveau de Spo0A~P, l'expression des gènes de sporulation est induite pour former le dernier stade de développement de *B. subtilis*, soit la formation d'une endospore (Fujita et al., 2005).



**Figure 1.6. Cascade de phospho-relais menant à différents stades de développement.**

Les histidines kinases KinA à KinE perçoivent des signaux externes et internes et transfèrent un groupement phosphate à Spo0F. Spo0F transfère à son tour le groupement phosphate à Spo0B, qui va le

transférer à Spo0A. SinR, le répresseur principal de l'expression des gènes impliqués dans la formation du biofilm (*bslA*, *epsA-O*, *tapA-sipW-tasA*). SinR est contrôlé par deux protéines anti-répresseur (SlrA et SinI) pendant la formation du biofilm. SlrR est une autre protéine anti-répresseur de SinR. Tirée et adaptée de (Yan *et al.*, 2016).

Le biofilm de *B. subtilis* est composé de cellules génétiquement identiques, mais exerçant des fonctions mutuellement exclusives. En effet, ce contrôle étroit dans la transcription des gènes permet une ségrégation des processus métaboliques coûteux pour la production des composantes de la matrice extracellulaire. Parmi ces gènes impliqués dans la formation de la matrice extracellulaire, on retrouve l'opéron *epsA-O* qui encode pour les protéines de synthèse des exopolysaccharides (EPS). Ces carbohydrates sont importants pour la structure du biofilm, la formation de la pellicule (biofilm à l'interface air-liquide) et la rétention d'eau (Arnaouteli *et al.*, 2021). Ensuite, l'opéron *tapA* encode trois protéines (TapA, SipW et TasA) qui sont impliquées dans la formation du biofilm. TapA sert d'ancre à la protéine TasA (fibres) au niveau de la paroi cellulaire et accélère la formation des fibres. TasA en tant que fibres est requis pour l'intégrité structurale du biofilm. Finalement, SipW encode une peptidase qui effectue des modifications post-traductionnelles en clivant la partie N-terminale de TapA et de TasA à la surface extracellulaire. De plus, la partie C-terminale de SipW active l'opéron *tapA* et *epsA-O* (Arnaouteli *et al.*, 2021). À la surface du biofilm, on retrouve la protéine BslA, conférant l'hydrophobicité au biofilm et qui est requise pour son architecture (Hobley *et al.*, 2013). Ensemble, ces composés favorisent la construction et le maintien d'une structure dense, l'adhésion aux surfaces solides et à la formation d'une pellicule à l'interface air-liquide. Elle permet également l'échange de matériel génétique dû à la proximité des cellules dans la matrice extracellulaire (Lécuyer *et al.*, 2018). En effet, le rapprochement des cellules dans un biofilm favorise les contacts bactérie-bactérie qui, via le mécanisme de conjugaison, transfère de l'ADN (Bourassa *et al.*, 2022).

#### 1.3.4 La sporulation et la germination

Le troisième morphotype de *B. subtilis* est la spore, plus spécifiquement, d'endospores. L'endospore est une structure ultrarésistante, dormante, donc métaboliquement non active et formée par certaines bactéries du phylum des *Bacillota* (Nicholson et al., 2000). Les principaux facteurs connus pour déclencher le processus de sporulation sont la carence nutritionnelle en carbone et en azote, ainsi qu'une forte densité de population (Driks, 1999; Grossman & Losick, 1988). Ces signaux externes vont être perçus par les mêmes histidines kinases décrites plus haut (Section 1.3.3 – La formation du biofilm), mais seulement KinA et KinB vont engendrer la cascade de phospho-transfert vers Spo0A, (Figure 1.6.) (LeDeaux et al., 1995). KinA, via le domaine PASA, perçoit la diminution du ratio NAD<sup>+</sup>/NADH en liant le NAD<sup>+</sup>, s'autophoryle et mènera à une augmentation de Spo0A~P. Également, il a été démontré que les domaines transmembranaires de KinB interagiraient avec les cytochromes de la chaîne de transport des électrons, ce qui régulerait son activité, faisant ainsi le lien entre l'apport énergétique dans la cellule (carence en carbone) et la sporulation (Kolodkin-Gal et al., 2013). Ensemble, ces deux histidines kinases mènent à une quantité élevée de Spo0A~P, ce qui enclenche le processus de différenciation cellulaire.

Les endospores survivent plusieurs années, résistantes aux conditions difficiles de l'environnement, en attente de conditions propices à la germination. Deux types d'inducteurs de germination ont été identifiés comme réactivant les spores de *B. subtilis* : les germinants de type nutriments de faibles poids moléculaires (par ex., acide aminé, sucres) et les inducteurs de germination de type non-nutriments (par ex., l'acide dipicolinique chélaté aux ions divalents Ca<sup>2+</sup>(CaDPA), dodécylamine) (Paidhungat & Setlow, 2000). La présence de nutriments spécifiques déclenche le processus de germination où les cellules dormantes, au métabolisme inactif, se différencient en cellules végétatives au métabolisme actif, perdant ainsi leur résistance aux stress

environnementaux. La liaison des nutriments aux récepteurs de germination déclenche le relâchement de l'acide dipicolinique chélaté aux ions divalents  $\text{Ca}^{2+}$ , permettant l'hydratation de la spore et la production d'enzymes lytiques du cortex (CLEs) (Chirakkal et al., 2002). Il a été récemment démontré que ceci se produit suite à l'oligomérisation des récepteurs au niveau de la membrane, ce qui crée des canaux qui favorisent l'efflux d'ions  $\text{K}^+$  et qui lèvent l'état de dormance en induisant la dépolarisation des cellules (Gao et al., 2023; Kikuchi et al., 2022). De plus, l'acide dipicolinique relâché des spores permet d'activer directement ces CLEs, provoquant la germination des spores. Trois récepteurs de germination principaux ont été caractérisés chez *B. subtilis* : GerA, GerB et GerK. Chacun est encodé par un opéron tricistronique produisant deux protéines transmembranaires (sous-unités A et B) et une lipoprotéine membranaire périphérique (sous-unité C) (Igarashi & Setlow, 2006). Également, il est connu de la littérature que *B. subtilis* possède deux autres opérons *yndD-yndE-yndF* et *yfkQ-yfkR-yfkT*, de la même famille que les récepteurs GerA, GerB et GerK, mais d'une spécificité inconnue (Steil et al., 2005). Aussi, il a récemment été démontré que la protéine GerD ainsi que les protéines GerA, GerB et GerK sont colocalisées dans un endroit spécifique nommé le germinosome (Wang et al., 2021). La protéine GerD joue un rôle important dans l'assemblage et la stabilité du germinosome. Cet assemblage de plusieurs milliers de protéines sur la membrane interne de la spore est requis pour une germination efficace. Finalement, *B. subtilis* possède une autre protéine PrkC (Protéine kinase C) qui induit la germination des spores en présence de lipide II (précurseur de la synthèse du peptidoglycane) et de muropeptides (Sun et al., 2023).

Les spores germent et débutent à nouveau leur croissance en réponse aux nutriments. Alors que ces processus sont bien caractérisés *in vitro*, la dynamique de sporulation et de germination ainsi que les déterminants moléculaires de la plante restent peu étudiés.

### 1.3.5 L'influence de la plante sur la différenciation de *B. subtilis*

Plusieurs mécanismes mis en place par la plante influencent directement la colonisation et la différenciation des espèces de *Bacillus*. Tout d'abord, la plante, par la sécrétion de sucrose, induit des changements métaboliques et morphologiques chez *B. subtilis*. En présence de sucrose, *B. subtilis* synthétise un polymère appelé « *levan* » qui, à son tour, stimule la production de surfactine, favorisant la motilité bactérienne sur un milieu solide grâce à une hyper-flagellation (Tian et al., 2021). De plus, il a été montré que l'ajout de sucrose sur des plants de tomates augmente la prévalence de *Bacillus* en conditions naturelles (Tian et al., 2021). L'acide malique, une autre molécule sécrétée par les plants de tomates, induit la formation du biofilm chez *B. subtilis* via l'histidine kinase KinD (Chen et al., 2012).

La composition de la paroi cellulaire de la plante peut également induire la différenciation des cellules motiles en cellules sécrétant la matrice extracellulaire. En effet, la paroi cellulaire végétale est principalement composée de polysaccharides tels que le xylane, la pectine, la cellulose, l'hémicellulose, l'arabinogalactane et la lignine (Carpita & Gibeaut, 1993; Kang et al., 2019). Ces polysaccharides ont été identifiés comme des molécules signal déclenchant la production de biofilm chez *B. subtilis* (Beauregard et al., 2013). Par ailleurs, *B. subtilis* possède plusieurs enzymes lui permettant de dégrader ces polymères complexes afin de les utiliser comme source d'énergie (Ochiai et al., 2007).

## 1.4 Les espèces de *Pseudomonas*

### 1.4.1 Général

Les bactéries appartenant au genre *Pseudomonas* sont à Gram négatif et incapables de former des spores. Certaines espèces sont bénéfiques aux plantes alors que d'autres sont néfastes. Aussi, certaines espèces de *Pseudomonas* sont des agents pathogènes opportunistes chez l'humain. Leur génome varie de ~4.6 à ~7.1 Mpb, a un contenu G+C variant de ~57 à ~66% et est dédié jusqu'à ~5,7% à la production de métabolites secondaires (Paulsen et al., 2005; Silby et al., 2011). Elles sont retrouvées dans plusieurs environnements tels que le sol, dans des environnements aquatiques, chez les plantes et les animaux (tractus gastro-intestinal). De manière similaire au biofilm de *B. subtilis*, le biofilm des espèces de *Pseudomonas* est composé d'exopolysaccharides, d'ADN extracellulaire, de protéines et de lipides (Thi et al., 2020).

### 1.4.2 Métabolites secondaires

L'étude et la découverte de nouveaux métabolites secondaires sont essentiels en médecine, en agriculture et en industrie. Les espèces de *Pseudomonas* produisent une panoplie de molécules bioactives, dont des lipopeptides cycliques et des sidérophores qui antagonisent la croissance des agents pathogènes, alors que d'autres produisent des toxines et des glycolipides qui contribuent à la virulence et à la pathogénicité. Ces « *biosynthetic gene clusters* ; BGCs », c.-à-d., le regroupement de deux ou plusieurs gènes dans un endroit du génome qui encodent une voie de biosynthèse pour la production des métabolites secondaires, inclut plusieurs classes telles que les NRPS (peptides non-ribosomales synthétase), PKs (polyketides synthase), RiPPs (peptides ribosomiques synthétisés et modifiés post-traductionnellement), terpènes, saccharides et des hybrides NRPS/PKS (Medema et al., 2015). Chez *Pseudomonas*, comme bien

d'autres genres bactériens, les NRPS et les PKS sont les plus prévalents (Alam et al., 2021). Les NRPS sont des enzymes modulateurs qui catalysent la synthèse de produits naturels peptidiques non-ribosomiaux. Les PKS sont des complexes enzymatiques qui produisent des polykétides, un autre type de métabolites secondaires comme les NRPS (Wang et al., 2014).

Un des systèmes de perception et de régulation très répandue chez les organismes est le système à deux composantes. Ce système reconnaît des molécules signales et induit une réponse physiologique pour s'adapter aux conditions environnementales (Stock et al., 2000). Chez *Pseudomonas*, il existe le système à deux composantes GacA/GacS. Conjointement avec la voie de signalisation Rsm, ce système est responsable de la production des métabolites secondaires (Brencic et al., 2009).

Plusieurs métabolites secondaires produits par *P. protegens* Pf-5, organisme modèle lors d'interactions bactérie-bactérie et d'interactions plante-bactérie, sont décrits ci-dessous. Certains ont été montrés comme ayant un effet négatif chez *B. subtilis*.

#### 1.4.3 2,4-diacétylphloroglucinol (2,4-DAPG)

Ce métabolite secondaire produit par une grande proportion d'espèces de *Pseudomonas* est connu pour jouer un rôle dans les interactions microbe-microbe et dans l'élicitation de la résistance systémique induite (Chae et al., 2020; Powers et al., 2015). Il peut aussi moduler l'équilibre des hormones végétales via sa nature chimique mimant structurellement l'auxine, une hormone impliquée dans la croissance végétale (Brazelton et al., 2008). L'opéron *phlACBD* (synthèse) et la *phlF* (répresseur transcriptionnel) mènent à la production du 2,4-DAPG. Brièvement, la synthèse débute avec le malonyl-CoA qui subit une cyclisation pour résulter en phloroglucinol, via l'action d'une synthase (PhID). Suivant l'activité d'une acétyltransférase, encodée par *phlACB*, le phloroglucinol est transformé en monoacétylphloroglucinol avant d'être



converti en 2,4-DAPG (Bangera & Thomashow, 1999). Ce composé phénolique semble affecter les organismes vivants de multiples façons. Chez les bactéries, le 2,4-DAPG causerait une rapide perméabilisation de la membrane menant à une fuite du contenu intracellulaire (Julian et al., 2021). Chez la levure *Saccharomyces cerevisiae*, le 2,4-DAPG agirait comme proton ionophore, qui dissipe le gradient de proton à travers la membrane mitochondriale (Troppens et al., 2013). Par conséquent, le découplage de la respiration et de la synthèse de l'ATP mène à l'inhibition de la croissance de l'organisme et peut mener à sa mort. Donc, le 2,4-DAPG semble affecter le métabolisme de manière non spécifique, mais qui impliquerait l'altération de la perméabilité membranaire et, par conséquent, entraîne une diminution de la production d'ATP.

#### 1.4.4 La pyolutéorine

La pyolutéorine est une molécule antibiotique produite par la voie NRPS et la voie PKS. La voie de synthèse de la pyolutéorine est connue et s'entrecoupe avec celle responsable de la production du 2,4-DAPG (Kidarsa et al., 2011; Shi et al., 2019). De manière brève, la synthèse de la pyolutéorine débute avec l'activation d'une proline par une ligase (PltF) et à son attachement à cette dernière. L'intermédiaire Pro-S-PltL est oxydé par PltE et chloré par PltA pour produire 4,5-dichloropyrrolyl-S-PltL. Le dichloropyrrole est étendu par la polyketide synthase PltBC suivi d'un clivage et de la formation du résorcinol, catalysé par PltG pour produire la pyolutéorine. Le phloroglucinol, produit par PhID dans la voie de synthèse du 2,4-DAPG, sera transformé en version chloré qui va lier le régulateur PltR et induire la transcription des gènes responsables de la voie de biosynthèse de la pyolutéorine (Nowak-Thompson et al., 1999). Contrairement au 2,4-DAPG, son mécanisme d'action reste très peu étudié. Basé sur des molécules aux structures similaires, les pyrrolomycines, il est possible que la pyolutéorine, comme le 2,4-DAPG, influencerait le gradient de proton et mènerait au découplage de la phosphorylation oxydative (Valderrama Katherine et

al., 2019). Par conséquent, cette molécule agirait comme agent dépolarisant pouvant mener à la mort cellulaire.

#### 1.4.5 Le cyanure d'hydrogène

Le cyanure d'hydrogène (HCN) est un autre métabolite secondaire volatile produit par diverses bactéries (gènes *hcnABC*). Brièvement, la synthèse du HCN débute avec son précurseur, la glycine. Cette dernière subit alors des étapes de décarboxylation oxydative menant à la formation du HCN et de CO<sub>2</sub> (Laville et al., 1998). Cette molécule volatile diffuse et atteint à sa cible, le cytochrome c oxydase et d'autres métalloenzymes, produisant une inhibition (Blumer & Haas, 2000). De manière intéressante, le HCN peut former un complexe avec le Fe pouvant potentiellement influencer l'activité métabolique des cellules (Dunbar & Heintz, 1996).

#### 1.4.6 Le système de sécrétion de type 6 (T6SS)

Le système de sécrétion de type 6 (T6SS) est répandu chez les bactéries. Le T6SS est une nanomachine qui transporte des protéines effectrices dans les bactéries et les eucaryotes avec l'effet de tuer les cellules cibles et d'acquérir des nutriments essentiels (par ex., des métaux) à leur survie (Coulthurst, 2019). Ce mécanisme de compétition est une véritable arme chimique dont le contact cellulaire est non essentiel à son efficacité. En effet, il a été montré que des protéines sécrétées dans le milieu extracellulaire permettent l'accumulation de métaux (Zn, Mn), permettant de contrer le stress oxydatif (Si et al., 2017).

#### 1.4.7 Interactions *Bacillus* – *Pseudomonas*

*Bacillus* et *Pseudomonas* sont des microorganismes couramment présents dans le sol, qui coexistent dans plusieurs environnements naturels et qui produisent un arsenal de métabolites secondaires. Bien que les études sur les interactions de paires ne soient pas totalement représentatives des interactions observées en conditions naturelles, les modèles réductionnistes sont essentiels à la compréhension des mécanismes de compétition bactérienne et des conséquences de la sécrétion de métabolites secondaires. La plupart du temps, *Pseudomonas* est considéré comme l'espèce inhibitrice envers *Bacillus* (Lyng & Kovács, 2023). Par conséquent, *Bacillus* déclenche des mécanismes adaptatifs (par ex., sporulation, inactivation des molécules aux propriétés antimicrobiennes) lorsqu'il fait face à *Pseudomonas* (Andrić et al., 2021; Grandchamp et al., 2017).

Une des interactions antagonistes les mieux décrites est l'effet du 2,4-DAPG, sécrété par *P. protegens*, sur *B. subtilis*. L'utilisation de mutants et la disponibilité commerciale de la molécule ont permis de démontrer que le 2,4-DAPG inhibe la formation du biofilm et retarde la sporulation chez *B. subtilis* (Powers et al., 2015). De plus, il a été montré que la pyolutéorine inhibe la croissance de *B. subtilis* par l'utilisation d'un mutant *pltA* chez *P. protegens* Pf-5 (Yan et al., 2018).

Une autre étude a porté sur l'importance fonctionnelle du biofilm. L'utilisation d'un modèle de compétition utilisant *B. subtilis* et *P. chlororaphis* a permis d'évaluer l'effet de la formation du biofilm sur l'efficacité du T6SS à atteindre directement les cellules. Ils ont montré que le biofilm crée une barrière physique, ce qui limite l'invasion de *P. chlororaphis* et empêche le contact cellule-cellule nécessaire à la translocation de certaines protéines effectrices dans le cytoplasme (Molina-Santiago et al., 2019). Dans le même ordre d'idée, la production d'une substance polymérique extracellulaire chez *E. coli* est liée à une augmentation du taux de survie des espèces produisant le biofilm

contre *Acinetobacter baylyi*, une autre bactérie utilisant le T6SS comme mécanisme d'attaque physique. Les EPS sont aussi sécrétés dans le milieu extracellulaire et agissent comme biens communs pour protéger les espèces qui ne produisent pas ces composés (Granato et al., 2023). Dans l'ensemble, la production d'un biofilm via la sécrétion de composés extracellulaires favorise la survie en limitant l'invasion de compétiteurs et en prévenant le contact physique cellule-cellule.

À notre connaissance, une seule étude décrit une activité inhibitrice directe de *Bacillus* envers *Pseudomonas* où *B. velezensis* FZB42 inhibe la croissance de *P. chlororaphis* par la sécrétion de la bacillaene. Cette dernière interagit avec le facteur d'élongation G (FusA) inhibant la synthèse protéique chez *P. chlororaphis* (Molina-Santiago et al., 2021).

#### 1.4.8 Limitation aux études d'interactions de paires

L'approche réductionniste permet d'éliminer une multitude de facteurs ce qui rend possible la découverte et la compréhension des mécanismes moléculaires. Toutefois, l'utilisation de modèles simplifiés, telle que les études en interactions de paires, ne permet pas d'extrapoler les observations à d'autres conditions et parfois néglige les capacités émergentes. Par exemple, lors d'un essai de compétition de paires, les résultats peuvent s'orienter vers une interaction positive, neutre ou négative alors que lorsqu'on complexifie le modèle, les conclusions ne sont pas aussi flagrantes. En effet, lorsqu'on considère les études d'interactions d'ordre supérieur (*higher-order interactions*), c.-à-d., prenant en considération plus de deux espèces, les résultats peuvent changer (Ludington, 2022).

Plusieurs raisons expliquent le manque d'études sur les modèles comprenant plus de deux espèces. D'abord, il est difficile de créer des communautés synthétiques stables étant donné le retrait de facteurs extrinsèques susceptibles d'engendrer des effets non

reproductibles en laboratoire (Delgado-Baquerizo, 2022). Ensuite, il devient ardu d'étudier les interactions en conditions naturelles en raison des propriétés physico-chimiques du sol qui rendent les analyses *in situ* quasi impossibles. Comme alternative, des sols transparents qui miment les compositions physiques du sol sont créés dans le but de se rapprocher davantage des conditions représentatives de l'environnement (Downie et al., 2014; Lozano-Andrade et al., 2022).

## 1.5 L'importance du fer

Le fer (Fe) est le 4<sup>e</sup> élément le plus abondant de la croûte terrestre et il est l'un des métaux les plus importants avec le manganèse (Mn) et le zinc (Zn) (Frey & Reed, 2012; Kehl-Fie & Skaar, 2010). Le Fe est impliqué dans plusieurs processus fondamentaux, tels que le transport d'électrons dans la respiration cellulaire pour la génération d'énergie, la fixation de l'azote et la synthèse d'ADN (Bird et al., 2011; Georgiadis et al., 1992; Puig et al., 2017). L'importance biologique du Fe s'explique par ses propriétés chimiques et son abondance. L'incorporation du Fe dans les protéines à titre de cofacteur permet aux métalloprotéines d'atteindre les bons niveaux de réduction et d'oxydation, de géométrie (complexe octaédrique) et d'état de rotation des électrons, permettant ainsi le bon fonctionnement des processus cellulaires nécessaires à la survie des cellules (Andrews et al., 2003; Beinert et al., 1997). Toutefois, malgré sa disponibilité, le Fe est une ressource limitante. Il y a plus de 2,5 milliards d'années, l'atmosphère est passée d'un environnement réducteur à oxydant en raison de la photosynthèse. Ainsi, avant le grand événement d'oxydation, en condition axénique, le Fe était majoritairement biodisponible et soluble sous forme de Fe(II). Cependant, l'oxydation du Fe(II) en Fe(III), causée par la présence d'oxygène, a conduit à sa précipitation sous forme insoluble (solide) sur l'ensemble de la Terre, diminuant drastiquement sa biodisponibilité (Canfield et al., 2013).

Le Fe est essentiel à presque tous les organismes vivants pour maintenir le métabolisme énergétique des cellules et une croissance suffisante. En effet, une

limitation en Fe peut entraîner la mort cellulaire. Parallèlement, sa concentration élevée peut avoir des effets toxiques pour les cellules (Andrews et al., 2003). Pour éviter ces situations, les bactéries ont des systèmes de régulation spécifiques pour maintenir un quota intracellulaire stable, communément appelé l'homéostasie métallique (Chandrangsu et al., 2017). L'homéostasie se définit comme des conditions internes, physiques et chimiques stables maintenues par les organismes vivants. Pour l'acquisition de ces métaux, les bactéries se reposent sur des mécanismes de transport interne et externe ainsi que sur le stockage.

## **1.6 La biodisponibilité du Fer**

Chaque environnement, qu'il s'agisse de l'océan, de la terre ou d'un hôte (par ex., un être humain), présente des défis à surmonter pour l'acquisition du fer. Le Fe existe principalement sous deux états oxydatifs: le Fe ferreux ; Fe(II) et le Fe ferrique; Fe(III). Le Fe(II) est la forme la plus facilement assimilable et est dominant en milieu acide et peu oxygéné. Cependant, dans le sol et dans l'océan où l'oxygène est abondant, le Fe existe principalement sous forme oxydée Fe(III), c'est-à-dire sous forme d'hydroxyde  $\text{Fe}(\text{OH})_3$  et d'oxyde  $\text{Fe}_2\text{O}_3$ , et est donc peu biodisponible (pH neutre;  $10^{-10}$  M) (Jolivet et al., 2004; Pérez-Guzmán et al., 2010). Chez l'être humain, le Fe est principalement piégé dans des molécules telles que l'hème, les métalloprotéines et les protéines de réserve comme les ferritines, ce qui a pour conséquence de prévenir la toxicité du Fe et restreindre son accessibilité dans le cas d'une invasion par des agents pathogènes (Murdoch & Skaar, 2022). Malgré les différences notables entre le sol et l'hôte, il en ressort que les bactéries, pour survivre, doivent posséder des systèmes de gestion du Fe qui permettront son acquisition et préviendront ses effets néfastes.

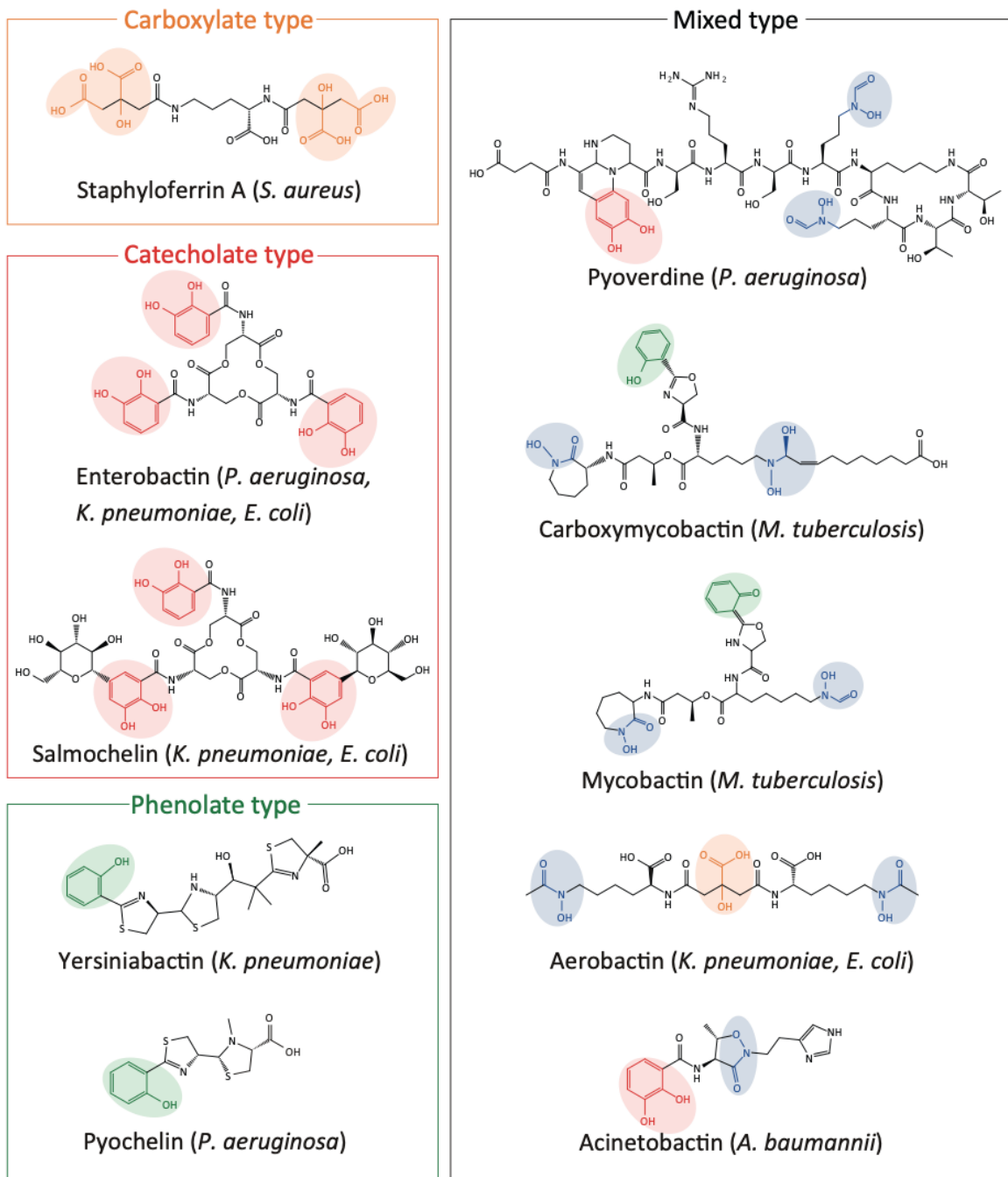
## 1.7 Les stratégies d'acquisition du Fe(III)

### 1.7.1 Les sidérophores – métallophores

La production de sidérophores est l'un des moyens les plus courants dans les écosystèmes pour acquérir le Fe (Wandersman & Delepelaire, 2004). Les sidérophores sont de petites molécules solubles de faible poids moléculaire (500 à 1500 daltons) ayant une haute affinité pour le Fe(III) (Ahmed & Holmström, 2014). Ils ont pour objectif principal de solubiliser le Fe(III) insoluble dans le sol, ou de le récupérer des protéines de l'hôte liant le Fe(III), telle la lactoferrine. Les sidérophores sont classés en quatre types selon les groupements fonctionnels de liaison au Fe(III): les catécholates (par ex., entérobactine, bacillibactine), les hydroxamates (par ex., alcaligine, ferrichrome), les carboxylates (par ex., rhizoferrine), les phénolates (par ex., pyocheline; Figure 1.7.). Les sidérophore de types mixtes possèdent une combinaison de ces groupements (par ex., pyoverdine, aérobactine; Figure 1.7.) (Wilson et al., 2016). Suivant leur liaison au Fe(III), les sidérophores sont reconnus par des récepteurs spécifiques au niveau de la membrane bactérienne. Les bactéries Gram positives et Gram négatives ont des moyens distincts pour assimiler le Fe(III) en raison de la présence de la membrane externe. Les bactéries Gram négatives ont des transporteurs dépendants de TonB qui reconnaissent le complexe Fe(III)-sidérophore à la surface cellulaire. Le complexe est ensuite transloqué dans l'espace périplasmique et franchit la membrane interne via des transporteurs de type ABC (ATP-Binding Cassette) (Noinaj et al., 2010). Suivant son internalisation dans le cytoplasme, le Fe(III) est libéré du sidérophore par sa réduction en Fe(II) puisque la majorité des sidérophores n'ont pas d'affinité pour le Fe(II). Le système d'acquisition du Fe(III) chez les bactéries Gram positives est légèrement différent, car elles n'ont pas de membrane externe et donc aucun récepteur dépendant de TonB. En contrepartie, ces bactéries à Gram positif ont des transporteurs de type ABC contenant des sous-unités de type perméase, des protéines de liaison aux sidérophores et des sous-unités ATPase du côté cytoplasmique (Dertz et al., 2006; Fukushima et al., 2013; Miethke et al., 2006; Sheldon & Heinrichs, 2015). Le Fe(III) est

ensuite libéré des sidérophores soit par l'hydrolyse des sidérophores ou par la réduction du Fe(III) en Fe(II).





**Figure 1.7. Les classes de sidérophores.**

Les sidérophores sont regroupés en plusieurs classes distinctes basées sur leur groupement fonctionnel au Fe(III). On retrouve les carboxylates

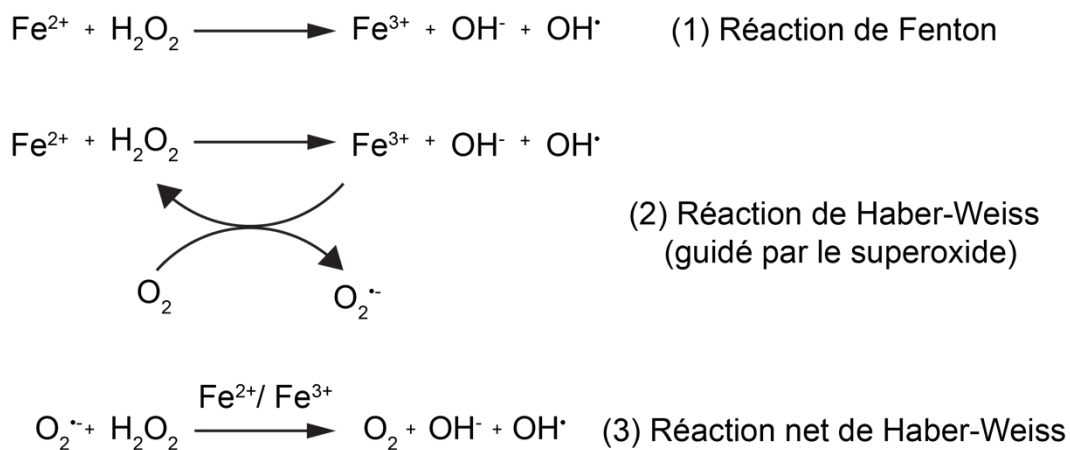
(orange), les catécholates (rouge), les phénolates (vert), les hydroxamates (bleu) et les types mixtes. Tiré de (Wilson et al., 2016).

Bien que les sidérophores aient une haute affinité pour le Fe(III), leur capacité à se complexer avec d'autres métaux est sous-estimée. Par exemple, une récente étude a montré que le sidérophore yersiniabactine (Ybt), produit par *Escherichia coli*, était capable de complexer le Fe(III) et le Zn(II) en fonction du pH. La Ybt, étant maintenant reconnue comme zincophore, permet à *E. coli* de survivre dans l'intestin où il existe un gradient de pH important selon l'axe longitudinal du tractus gastro-intestinal (Behnsen et al., 2021). Malgré le fait que les métallobactines aient généralement une plus grande affinité pour le Fe(III), ils jouent un rôle central dans l'acquisition de nombreux métaux essentiels dans plusieurs systèmes biologiques (Kraemer et al., 2015).

### 1.7.2 La relation entre l'oxygène et le Fe

L'atmosphère est composée à 21% d'oxygène ( $O_2$ ), 78% d'azote ( $N_2$ ) et le 1% résiduel est attribuable au dioxyde de carbone ( $CO_2$ ), à l'hydrogène ( $H_2$ ) et au néon (Ne). L'exposition constante à l' $O_2$  et à  $N_2$  conduit à la formation de dérivés réactifs, notamment les espèces réactives de l'oxygène (ROS), les espèces réactives de l'azote (RNS) et les espèces réactives de chlore (RCS) (Ezraty et al., 2017). Le terme ROS englobe le superoxyde ( $O_2^-$ ), le peroxyde d'hydrogène ( $H_2O_2$ ) et le radical hydroxyde ( $\bullet OH$ ), et est utilisé de manière générique en raison de la difficulté à identifier précisément l'espèce réactive en cause. Ces molécules sont générées par des réactions d'oxydation-réduction (redox). En effet, la production de ces dérivés réactifs résulte d'une réaction accidentelle entre des donneurs d'électrons univalents et l' $O_2$ . Les protéines présentes dans la chaîne de transport des électrons sont des exemples de donneurs d'électrons univalents, tout comme les métaux de type redox (Fe, Cu), les cofacteurs flavine adénine dinucléotide ( $FADH_2$ ) et les quinones (Imlay, 2013).

La réaction de Fenton a été décrite pour la première fois en 1894, et mène à la formation de ROS ayant des implications multiples (Fenton, 1894). Elle est étroitement liée à la réaction de Haber-Weiss, qui explique la génération du  $\bullet\text{OH}$  catalysée par le Fe (Figure 1.8), et survient dans de nombreux systèmes biologiques (Haber & Weiss, 1932; Kehrer, 2000). L'étape (1) oxyde le Fe(II) en Fe(III) en présence de  $\text{H}_2\text{O}_2$ , qui se décompose en espèces radicalaires, produisant le radical hydroxyle ( $\bullet\text{OH}$ ), le deuxième oxydant le plus puissant connu à ce jour, après le fluor. Il est important de noter que la réaction de Fenton est réversible, c'est-à-dire que le Fe(III) peut être régénéré à partir du Fe(II) par plusieurs mécanismes, comme la présence du  $\text{O}_2^{\bullet-}$  (réaction 2,3).



**Figure 1.8. La réaction de Fenton et de Haber-Weiss.**

Cette réaction d'oxydation consiste à décomposer le peroxyde d'hydrogène par des sels métalliques afin de produire des espèces radicalaires (1). Cette réaction est réversible, par exemple, en présence de l'anion superoxyde (2). Créée avec Illustrator.

Plusieurs conditions doivent être respectées pour que la réaction de Fenton se produise. En raison de la spéciation du Fe, le pH est un facteur important à considérer.

Ainsi, le Fe doit être maintenu en solution et sous la forme soluble Fe(II), fréquemment retrouvé en condition acide (pH 3-4), puisque c'est ce dernier qui agit à titre de substrat à la réaction (Barb et al., 1949; Fischbacher et al., 2017). Cependant, la présence de ligands liant le Fe(III) en condition neutre ou basique aide à maintenir le Fe(III) en solution, remplissant ainsi une condition importante pour la réaction de Fenton (Contreras et al., 2011; Xiao et al., 2018; Xu & Jordan, 1988). Ceci peut favoriser sa réduction subséquente par le ligand (directement) ou via d'autres mécanismes (par ex., des réductases extracellulaires) qui vont promouvoir la réaction de Fenton (Schröder et al., 2003). Pour conclure, la mise en place de mécanismes qui préviennent le contact entre l'O<sub>2</sub> et le Fe contribue à limiter l'accumulation de ROS néfastes aux cellules.

#### 1.7.3 Les effets du stress oxydatif chez *B. subtilis*

La présence de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> et la génération des ROS peuvent avoir des répercussions dévastatrices sur l'activité et la structure des protéines. Elles peuvent, par exemple, induire des dommages à l'ADN, induire la peroxydation des lipides (altération de la fluidité et de la fonction membranaire) pouvant entraîner la mort cellulaire (Fasnacht & Polacek, 2021). Chez *B. subtilis* le stress oxydatif cause des cassures de l'ADN qui préviennent la différenciation bactérienne et la formation du biofilm (Gozzi et al., 2017).

#### 1.7.4 Les systèmes de protection du stress oxydatif chez *B. subtilis*

L'existence de systèmes de gestion du stress oxydatif est essentielle pour la survie des bactéries au métabolisme aérobique. Ces systèmes sont régulés par des facteurs de transcription qui détectent les stress oxydatifs et qui régulent l'expression de nombreux gènes impliqués dans la détoxification des dérivés réactifs. Les métaux de transition jouent un rôle important dans la montée du stress oxydatif. Pour cela, des systèmes de transport qui contrôlent l'entrée et la sortie de certains métaux clés existent puisque ces derniers sont intimement liés à la génération de ROS.

Pour limiter une accumulation excessive du Fe et préserver l'homéostasie métallique, les bactéries possèdent un système de contrôle de la concentration intracellulaire du Fe mis en place via la régulation des mécanismes d'acquisition du Fe(III) par Fur (*Ferric Uptake Regulator*) (Andrews et al., 2003). Fur est une métalloprotéine responsable de l'homéostasie du Fe. Elle régule négativement l'expression de ~40 gènes impliqués dans la biosynthèse des sidérophores et de leur transport chez *B. subtilis*. À titre d'exemple, chez *B. subtilis*, la protéine Fur régule l'activation de l'opéron *dhbA-F* ainsi que la synthèse de transporteurs pour des xénosidérophores (Ollinger et al., 2006). Son importance dans la gestion de l'équilibre du Fe intracellulaire a été mise en évidence par l'utilisation de mutants du gène *fur*, où une perte de fonction de la protéine peut entraîner l'augmentation de Fe labile dans la cellule, entraînant une élévation du stress oxydatif et une hausse du taux de mortalité (Abdul-Tehrani et al., 1999; Fontenot & Ding, 2023; Keyer & Imlay, 1996). Pour éviter cette situation, les bactéries éliminent le Fe labile de plusieurs façons afin d'éviter son utilisation comme substrat dans la réaction de Fenton. Les bactéries peuvent utiliser leur sidérophore pour lier fortement le Fe(III), empêchant sa réduction en Fe(II), ou encore produisent des protéines qui exportent Fe pour son relâchement dans le milieu extracellulaire (Guan et al., 2015; Marcus et al., 2008). Elles peuvent aussi augmenter la production de protéines servant de réserves telles que les ferritines (Smith, 2004).

Chez *B. subtilis*, un deuxième homologue de la protéine Fur a été découvert : PerR (*Peroxide Regulator*). La protéine PerR est un dimère qui contient deux ions métalliques par monomère (PerR: Zn, Fe) et permet de s'attaquer au H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> afin de diminuer sa concentration (Lee & Helmann, 2006). Le régulon de PerR inclut la production de la catalase KatA, qui décompose le H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en H<sub>2</sub>O et en O<sub>2</sub>, une hydroperoxyde réductase (AhpCF), une protéine de réserve du Fe (MrgA), la synthèse de porphyrine (opéron *hem*) et une pompe à efflux Fe(II) (PfeT) (Fuangthong et al., 2002; Guan et al., 2015). Ensemble, le système PerR permet le stockage du Fe et la dégradation du H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

Un troisième homologue de la protéine Fur, Zur (*Zinc uptake regulator*), régule l'acquisition du zinc (Zn) chez certaines espèces, dont *B. subtilis* (Gaballa & Helmann, 1998). Le Zn est parmi les métaux de transition essentiels pour les organismes vivants. Il joue également le rôle de cofacteur pour plusieurs protéines et est un élément structural important pour l'activité de plusieurs protéines. Le régulon Zur comprend un transporteur (de type ABC) de haute affinité pour le Zn encodé par l'opéron *znuACB* et une métallochaperone ZagA qui aide à rediriger, en cas de carence, le « pool » de Zn où c'est le plus critique pour maintenir le métabolisme actif (Ahmed et al., 2002). En somme, l'acquisition de Zn protège contre le stress oxydatif en remplaçant les métaux redox actifs tels que le Fe pour protéger les protéines avec un groupement fonctionnel thiol de l'oxydation, altérant ainsi la fonction protéique (Paola et al., 2020).

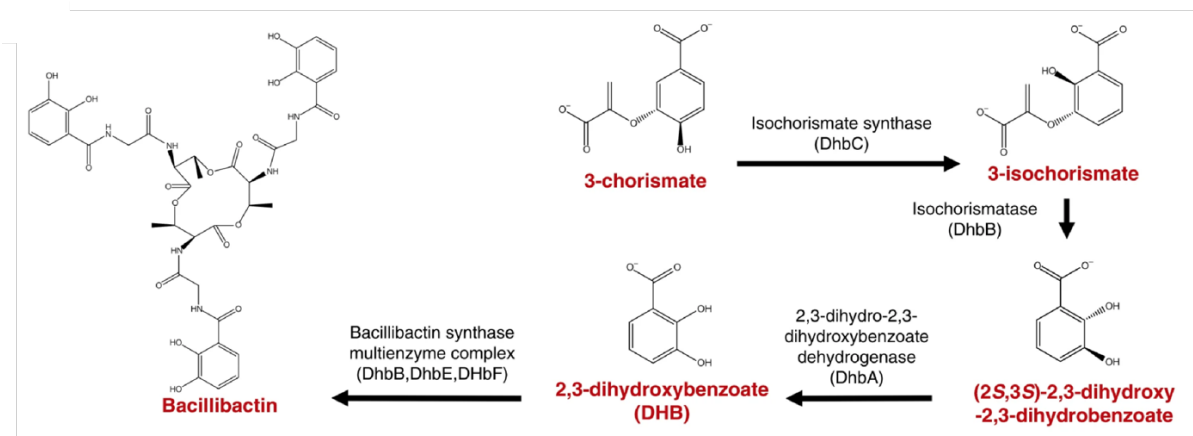
Un autre métal essentiel au métabolisme cellulaire est le manganèse (Mn) (Glasfeld et al., 2003). Le régulon MntR (régulateur de transport de manganèse) contrôle l'activation de protéines impliquées dans l'importation encodée par l'opéron *mntABCD* et le gène *mntH*, ainsi que dans le transport extracellulaire en cas d'excès encodé par les gènes *mneP* (pompe à efflux primaire) et *mneS* (pompe à efflux secondaire) (Paola et al., 2020). Le Mn sert également de cofacteur de la superoxyde dismutase qui permet de détoxifier les ROS (Aguirre & Culotta, 2012).

Ces facteurs de transcription sont finement régulés pour maintenir l'homéostasie métallique. Cet équilibre est crucial pour le bon fonctionnement des composantes cellulaires et prévient toutes perturbations causées par les ROS pouvant entraîner la mort cellulaire. Il est également important de noter que ces systèmes sont majoritairement activés en réponse à des stress intracellulaires.

### 1.7.5 Le système d'acquisition du Fe chez *B. subtilis* NCIB 3610.

Une adaptation importante pour l'acquisition de micronutriments essentiels chez *B. subtilis* repose sur la production des sidérophores 2,3-DHB et bacillibactine, cette dernière étant un des sidérophores ayant la plus haute constante d'affinité pour le Fe connue à ce jour (Dertz et al., 2006). La production des sidérophores permet à *Bacillus* de récupérer suffisamment de Fe(III) pour croître et former un biofilm (voir section 1.3.3), important pour sa persistance dans divers environnements (Figure 1.4). Ces deux sidérophores sont produits par le même opéron, soit *dhbACEBF* (Figure 1.9). La voie de biosynthèse du premier sidérophore 2,3-DHB débute à partir du 3-chorismate issu de la voie shikimate. DhbC, une isochorismate synthase, synthétise le 3-isochorismate. Ce dernier est converti en (2S,3S)-2,3-dihydroxy-2,3-dihydrobenzoate par DhbB, une isochorismatase. Ensuite, DhbA, une 2,3-dihydro-2,3-dihydroxybenzoate dehydrogenase, agit sur le 2,3-dihydroxybenzoate (2,3-DHB). Finalement, le complexe multienzymatique formé de DhbB-DhbE-DhbF participe à la synthèse de la bacillibactine (BB) (May et al., 2001). 2,3-DHB, un produit intermédiaire de la synthèse de la bacillibactine, est capable de lier le Fe(III) en ratio 3:1 (L:M) avec une affinité modérée ( $\log K = 20,5$ ) comparé à la BB qui lie le Fe(III) en ratio 1 :1 ( $\log K = 47,6$ ) (Figure 1.9) (Dertz et al., 2006; Porwal et al., 2015). De manière complémentaire, il a été montré que lors de la formation de biofilm, *B. subtilis* produit 10 fois plus de 2,3-DHB que de BB (Rizzi et al., 2019).

Les complexes ferriques 2,3-DHB et BB sont reconnus par le transporteur de type ABC FeuABC suivant leur liaison au Fe(III). Après leur import dans la cellule, l'hydrolase trilactone BesA catalyse l'hydrolyse du complexe Fe(III)-BB en monomères, et le Fe(III) est relâché au niveau du cytosol (Miethke et al., 2006). Plusieurs questions persistent concernant le devenir de ces monomères : sont-ils réutilisés par le complexe multienzymatique pour la synthèse d'une nouvelle BB ou simplement dégradés ?



**Figure 1.9. Voie de la synthèse des sidérophores 2,3-dihydroxybenzoate et bacillibactine chez *B. subtilis*.**

Ce schéma représente la voie de synthèse conjointe du 2,3-DHB et de la BB. Tirée et adaptée de Qin et al., 2019.

Bien que l'action primaire des sidérophores soit d'acquérir le Fe(III) extracellulaire, des fonctions secondaires sont possibles. Par exemple, le sidérophore 2,3-DHB est un composé phénolique capable d'effectuer des réactions redox. Par conséquent, en présence de Fe(III), la molécule 2,3-DHB peut être oxydée et réduire le Fe(III) en Fe(II) (Xu et Jordan, 1988). Ce processus d'oxydoréduction est moins probable lorsque le Fe(III) est fortement lié à la BB due à sa force de liaison au Fe(III). Évidemment, la formation du Fe(II) en présence du 2,3-DHB peut avoir des répercussions néfastes sur la croissance bactérienne en générant des ROS, entraînant une élévation du stress oxydatif.

Outre les sidérophores, certaines espèces bactériennes possèdent le système de transport EfeUOB ancré dans la membrane pour l'import du Fe(II) et du Fe(III). Ce système est composé d'une peroxydase Fe(II) (EfeB), une protéine de liaison au Fe(III) (EfeO) et d'une perméase (Miethke, Monteferrante, et al., 2013). Ainsi, dans un



environnement où il y a une forte abondance en Fe(II), par exemple en milieu acide, il est oxydé en Fe(III) permettant son import dans la cellule et subséquemment sa réduction dans le cytoplasme. Certaines souches de *B. subtilis* reposent sur ce système dans des conditions spécifiques de culture pour récupérer le Fe.

#### 1.7.6 Les sidérophores produits par les espèces de *Pseudomonas*

Les espèces de *Pseudomonas* produisent une grande variété de sidérophores, dont la pyochéline, la pseudomonine, la yersiniabactine, la corrugatine, l'achromobactine et la quinolobactine. Cependant, la pyoverdine et la pyochéline demeurent les sidérophores principaux produits par la majorité des espèces de *Pseudomonas* (Ghssein & Ezzeddine, 2022). La pyoverdine confère aux *Pseudomonas* une apparence fluorescente en raison de la présence d'un chromophore dans sa structure chimique. Plus de 100 classes de pyoverdine différentes ont été identifiées et, dans certains cas, confèrent la spécificité de reconnaissance entre le sidérophore et son récepteur, qui est nécessaire pour l'acquisition du Fe(III) (Berendsen et al., 2015). Par conséquent, toutes les espèces productrices de pyoverdine n'ont pas accès à toutes les classes de pyoverdine.

La pyoverdine forme un complexe 1:1 (L : M) avec le Fe(III). Cela signifie qu'une seule molécule de pyoverdine lie les six liens de coordination du Fe(III) et possède une constante d'affinité  $\log K = 30,8 \text{ M}^{-1}$ . La pyoverdine a une affinité très faible pour le Fe(II), avec une constante d'affinité  $\log K = 9 \text{ M}^{-1}$ , ce qui explique sa sélectivité pour le Fe(III). En revanche, la pyochéline lie le Fe(III) en ratio 2:1 (L:M) et possède une constante d'affinité très faible;  $\log K = 5,3 \text{ M}^{-1}$  (Hannauer et al., 2012). Bien que sa constante d'affinité soit faible par rapport à d'autres sidérophores, elle est capable de lier plusieurs autres métaux, tels que le cobalt ( $\text{Co}^{2+}$ ), le cuivre ( $\text{Cu}^{2+}$ ), le manganèse ( $\text{Mn}^{2+}$ ) et le zinc ( $\text{Zn}^{2+}$ ), grâce à ses sites de liaison autres que l'oxygène, tels que les atomes de soufre et d'azote (Braud et al., 2009). Cette versatilité dans la sélectivité des métaux

qu'elle lie confère un avantage significatif aux espèces la produisant dans la compétition nutritionnelle.

#### 1.7.7 Les conséquences et avantages de la sécrétion des sidérophores dans le milieu environnant.

Les mécanismes de synthèse, de régulation et d'acquisition des sidérophores sont bien caractérisés. Néanmoins, les conséquences écologiques et évolutives de la sécrétion des sidérophores restent peu explorées. En effet, les sidérophores sont des molécules solubles et inévitablement prompts à être perdus par diffusion. Plusieurs questions subsistent à savoir pourquoi les bactéries produisent ces métabolites à coût élevé qui risquent de ne pas retrouver leur chemin vers la bactérie productrice. L'hypothèse qui a émergé pour expliquer cette perte implique le style de vie des bactéries (Kramer et al., 2020). En effet, les bactéries vivent principalement en groupe (communauté polymicrobienne) et non de manière solitaire (individuelle). Ce mode de croissance favoriserait donc la récupération du sidérophore complexé par un membre de la collectivité même si cette dernière n'est pas la productrice, optimisant ainsi le rapport coût de production vs bénéfice (Figure 1.10.). Néanmoins, une proportion substantielle de sidérophores serait perdue par diffusion dans ce système. Dans le sol, le réel avantage de l'utilisation des sidérophores serait qu'il débute la solubilisation du Fe(III) même si la bactérie n'est pas à proximité, améliorant la probabilité que la souche récupère ce métal essentiel lors de sa croissance (Leventhal et al., 2019; Völker & Wolf-Gladrow, 1999).

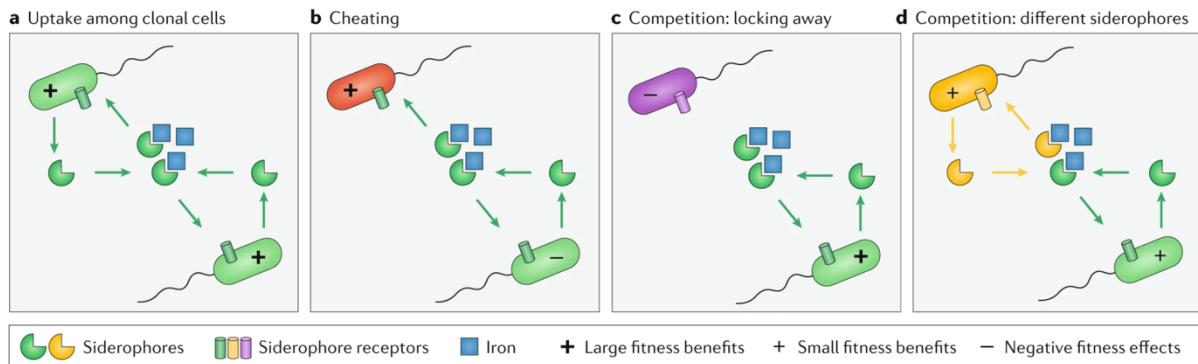
Dans un environnement aquatique où la turbulence de l'eau est très élevée, certaines bactéries produisent des sidérophores qui demeurent ancrés dans la membrane (molécules amphiphiles), ce qui limite drastiquement leur perte (Martinez et al., 2003; G. Xu et al., 2002). En contrepartie, cette stratégie serait peu efficace dans le sol où le

Fe réside sous forme d'agrégats, qui posent ainsi une contrainte physique et temporelle à la récupération du Fe(III) (Figure 1.10.).

#### 1.7.8 Théories co-évolutives

Dans une population clonale, les individus produisent les mêmes sidérophores ainsi que les récepteurs spécifiques à leur acquisition. De cette manière, l'ensemble des membres de la communauté bénéficient des sidérophores produits, démontrant le partage des biens communs (Figure 1.10.).

Dans une population polymicrobienne, la compétition est omniprésente pour récupérer le Fe limitant. Une des stratégies de compétition employée par les bactéries est de produire un type de sidérophore qu'eux seuls peuvent récupérer, en faisant ainsi un bien exclusif. Le Fe serait alors préférentiellement acquis par les espèces possédant le récepteur spécifique au sidérophore présent dans l'environnement (Figure 1.11.) (Kramer et al., 2020). Cependant, il est possible que d'autres bactéries produisent des sidérophores de plus haute affinité, déplaçant ainsi l'équilibre du Fe(III) vers le sidérophore le plus efficace. De la même façon, certaines bactéries produisent des récepteurs favorisant l'acquisition de xénosidérophores (Figure 1.10., B). Ainsi la cinétique, la quantité et la force de liaison sont des facteurs non négligeables à considérer dans l'étude de la compétition interspécifique pour le Fe(III) (Kramer et al., 2020).



**Figure 1.10. Stratégies de compétition pour l'acquisition du Fe(III) par les sidérophores dans les interactions sociales.**

**a**, L'acquisition du Fe(III) dans une population clonale où chacune des bactéries participe en sécrétant leur sidérophore (Partage des biens communs). **b**, Émergence des tricheurs qui récupère le Fe(III)-sidérophore sans partage le coût de production (Tragédie des communs). **c**, La sécrétion d'un sidérophore où l'espèce compétitrice ne possède pas le récepteur correspondant; le Fe(III) est « verrouillé ». **d**, La production de plusieurs types de sidérophores où chacune des espèces peut récupérer le Fe(III). Tirée de (Kramer *et al.*, 2019).

### 1.7.9 Rôles des sidérophores dans l'établissement de la maladie

Récemment, il a été montré que le microbiote racinaire et ses sidérophores peuvent jouer le rôle de « facilitateur » ou « d'inhibiteur » dans la croissance de l'agent pathogène *Ralstonia solanacearum*, une bactérie responsable de l'infection de nombreuses plantes d'intérêts agricoles. En effet, la présence et l'abondance de ces derniers pourraient agir comme outil prédictif dans l'établissement de la maladie (Gu *et al.*, 2020). Tel que mentionné auparavant, certains sidérophores sont des biens communs et peuvent être récupérés par d'autres espèces, tandis que d'autres sont exclusifs. Par la production de sidérophores, certains membres du microbiote facilitent

l'invasion de *R. solanacearum*, alors que d'autres suppriment sa croissance, protégeant ainsi la plante. Ces résultats ouvrent la voie à une agriculture personnalisée en créant un consortium bactérien capable de lutter contre les microorganismes nuisibles et ainsi réduire notre utilisation de pesticides chimiques.

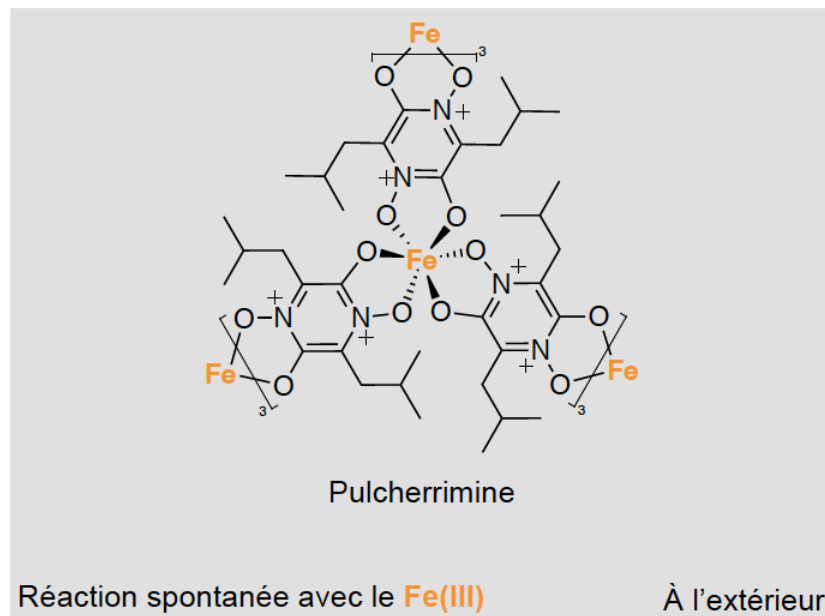
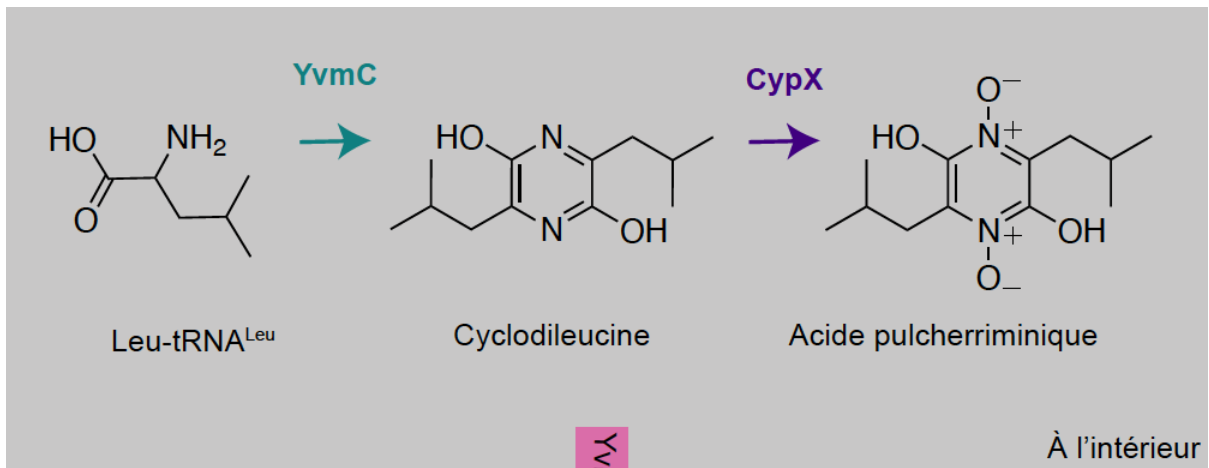
#### 1.7.10 L'acide pulcherriminique

L'acide pulcherriminique (PA) est la seule molécule connue à ce jour produite par des bactéries et levures, qui lie le Fe(III) mais qui se comporte différemment des sidérophores (Canale-Parola, 1963; Kluyver et al., 1953). La liaison de l'acide pulcherriminique au Fe(III) entraîne sa précipitation sous la forme du complexe pulcherrimine, contrairement aux sidérophores dont le rôle premier est de solubiliser le Fe(III) (Melvydas et al., 2016). Cette observation inattendue s'explique par la nature chimique de la PA, qui possède des groupements hydroxamate de part et d'autre de la molécule (molécule symétrique) qui engendrent ainsi une matrice polymérique caractéristique de la formation d'un précipité (voir Figure 1.11.) (Kluyver et al., 1953).

En 2019, il a été démontré, par la création d'un modèle mathématique combiné à l'utilisation de mutants de délétion, que l'accumulation extracellulaire de la pulcherrimine (PA+Fe) restreint l'expansion du biofilm chez *B. subtilis* via la limitation en Fe(III) (Arnaouteli et al., 2019). Ce modèle mathématique prend en compte que le Fe(III) lié à la pulcherrimine est inaccessible, et repose sur la supposition que le précipité n'est pas biodisponible. À l'opposé, d'autres études affirment que la pulcherrimine est un sidérophore, ce qui est incohérent avec l'insolubilité du complexe ferrique (Krause et al., 2018). Une étude a même affirmé que *B. subtilis* possède tous les gènes nécessaires à l'exportation et à l'importation de la PA, sans l'avoir démontré expérimentalement (Rychel et al., 2020). Ces contradictions dans la littérature soulevaient chez nous de nombreuses questions sur l'exactitude des conséquences

de la formation du complexe pulcherrimine sur le métabolisme cellulaire, ainsi que son rôle physiologique et écologique.

L'acide pulcherriminique est une petite molécule de poids moléculaire 256,30 g/mol qui est produite en deux étapes enzymatiques (Cryle et al., 2010; Gondry et al., 2009; Uffen Robert L. & Canale-Parola E., 1972). Tout d'abord, le gène *yvmC* (747 pb) code pour une cyclodipeptide synthase qui cyclise deux molécules de leucine pour produire la dicycloleucine (produit intermédiaire) (Figure 1.11.). Ensuite, le gène *cypX* (1,2 kb) en opéron avec *yvmC*, code pour une oxydase cytochrome P450 cyclo-L-leucyl-L-leucyl dipeptide qui oxyde le produit intermédiaire au niveau des atomes d'azote pour former le produit final, l'acide pulcherriminique (Figure 1.11.). La PA est ensuite excrétée via le transporteur putatif YvmA, qui est codé par le gène *yvmA* (1,2 kb) (Randazzo et al., 2016). L'opéron *yvmC-cypX* et *yvmA* sont régulés par le facteur de transcription PchR, qui agit comme répresseur constitutif. Ainsi, l'inactivation de *pchR* conduit à une production constante de PA (Randazzo et al., 2016).



**Figure 1.11. Voie de synthèse de l'acide pulcherriminique et formation du complexe ferrique à l'extérieur de la cellule.**

Ce schéma illustre les étapes de la synthèse de l'acide pulcherriminique à l'intérieur de la cellule et sa liaison au Fe(III), de manière spontanée, à l'extérieur de la cellule. Une cyclodipeptide synthase (YvmC) cyclise deux molécules de leucine pour former la cyclodileucine. Ensuite, un cytochrome P450 dipeptide oxydase (CypX) oxyde la cyclodileucine qui

mène à l'acide pulcherriminique. Son transport à l'extérieur de la cellule est médié par le transporteur YvmA et une fois la molécule à l'extérieur de la cellule, l'acide pulcherriminique lie le Fe(III). Créée avec ChemDraw et Illustrator.

## **1.8 La relation entre le Fe et le biofilm chez *B. subtilis***

### **1.8.1 L'importance de l'acquisition du fer pour la formation d'un biofilm chez *B. subtilis* et vice versa**

Comme mentionné précédemment, le biofilm est le mode de vie le plus répandu dans l'environnement. Plusieurs études se sont intéressées aux signaux déclenchant sa formation ainsi qu'aux mécanismes permettant la répartition des nutriments au sein de cette communauté où les cellules sont étroitement entassées les unes contre les autres (Beauregard et al., 2013; Chen et al., 2015; Chou et al., 2022; Townsley et al., 2018; Vlamakis et al., 2013; Wilking et al., 2013).

Bien que l'importance du Fe dans les processus physiologiques soit connue, comprendre les mécanismes d'acquisition et de distribution des nutriments dans l'ensemble des cellules du biofilm est tout aussi crucial. Tout d'abord, pour former un biofilm, une grande quantité de Fe dans l'environnement est requise (Kolodkin-Gal et al., 2013; Rizzi et al., 2019). En effet, une concentration élevée de Fe favorise une forte expression des gènes associés à la formation de la matrice extracellulaire (par. ex., l'opéron *tapA*) et conduit à une densité élevée de « rides » à la surface du biofilm, ce qui témoigne d'une structure robuste et organisée. De plus, la formation du biofilm et la production de sidérophores sont nécessaires pour maintenir l'homéostasie du Fe, c.-à-d., une croissance cellulaire active avec une concentration intracellulaire de Fe stable (Rizzi et al., 2019). Outre sa fonction d'acquisition du Fe, le biofilm servirait également de réserve puisque sa concentration en Fe dépasse largement celle des cellules.



Cependant, seule une fraction de ce Fe piégé dans le biofilm est accessible, et ce n'est qu'au moment de la régénération du biofilm en Fe que les cellules peuvent en bénéficier, suggérant plusieurs rôles à la séquestration du Fe dans le biofilm (Rizzi et al., 2020). Par exemple, il a été déterminé que dans les strates inférieures du biofilm où l'oxygène est limitant, que le Fe agirait comme accepteur final d'électron (Qin et al., 2019).

### 1.8.2 Les stratégies alternatives à l'utilisation des sidérophores – le transfert d'électron extracellulaire

Les microorganismes aérobies utilisent l'O<sub>2</sub> comme accepteur final d'électrons pour la respiration cellulaire afin de générer de l'énergie sous forme d'ATP. Plusieurs des microorganismes anaérobies facultatifs, bien qu'ils préfèrent l'O<sub>2</sub>, peuvent utiliser le Fe(III) comme accepteur alternatif d'électrons via le transfert d'électrons extracellulaire (EET; *Extracellular Electron Transfer*) (L. Shi et al., 2016). Cette stratégie est courante chez les bactéries Gram négatives et il a été récemment démontré que les bactéries Gram positives sont également capables de transloquer des électrons à l'extérieur de la cellule pour réduire le Fe(III) (Light et al., 2018). Ce transport d'électrons dans l'environnement extracellulaire facilite la réduction du Fe(III) en Fe(II) et peut ainsi favoriser l'acquisition de Fe. Parallèlement, cette réduction peut avoir des répercussions positives sur la force proton motrice et le métabolisme via la respiration du Fe(III) comme accepteur final d'électrons. Cette dualité soulève la question suivante : est-ce que l'EET est impliquée dans l'acquisition nutritionnelle ou dans la respiration cellulaire? À ce jour, cette question reste sans réponse (Jeuken Lars J. C. et al., 2020). Cependant, une explication logique a été avancée impliquant la concentration de Fe(III) et la quantité d'O<sub>2</sub>. Dans des conditions déficientes en Fe(III), l'EET permettrait l'acquisition de Fe par sa solubilisation. Inversement, en condition non limitante de Fe(III) et en absence d'O<sub>2</sub>, l'EET permettrait la respiration pour établir la force proton motrice afin de générer suffisamment d'ATP pour soutenir le métabolisme

cellulaire (Jeuken Lars J. C. et al., 2020). Comme mentionné préalablement, cette dernière situation surviendrait dans les couches inférieures d'un biofilm bactérien afin de maintenir une activité métabolique (Qin et al., 2019).

## 1.9 Hypothèses du projet de doctorat

Les impératifs du développement durable nous obligent à réduire de manière significative l'utilisation de pesticides chimiques en agriculture pour diminuer les risques pour la santé humaine et l'environnement. Cependant, les solutions alternatives basées sur l'utilisation de microorganismes bénéfiques pour remplacer les pesticides présentent souvent une efficacité inférieure, ce qui pourrait avoir des impacts socio-économiques importants. C'est pourquoi l'un des axes de recherche du laboratoire vise à identifier les causes de ces rendements variables et cherche à améliorer l'efficacité de ces bactéries bénéfiques.

La création de modèles simplifiés a accéléré la découverte de nouveaux mécanismes moléculaires, ce qui représente une avancée significative dans la compréhension des interactions plante-bactérie et bactérie-bactérie. Cette approche a également soulevé de nombreuses questions, notamment sur l'influence que la plante joue sur son l'activité bactérienne et sur les mécanismes adaptatifs que mettent en place les bactéries bénéfiques pour mieux compétitionner entre elles.

Nos hypothèses pour ce projet de doctorat étaient les suivantes :

- 1) *A. thaliana*, par la sécrétion d'exsudats racinaires, module l'activité métabolique de *B. subtilis*.
- 2) L'état de dormance de *B. subtilis* est dépendante du site de colonisation (partie foliaire vs racinaire)
- 3) Certaines espèces de *Pseudomonas* nuisent à la présence de *B. subtilis* sur la racine via la production de métabolites secondaires.

- 4) La sécrétion d'acide pulcherriminique par *B. subtilis* en présence de *P. protegens* démontre l'importance du Fe(III) dans l'interaction.

## 1.10 Objectifs du projet de doctorat

L'objectif global de mon projet de doctorat était d'identifier les déterminants potentiels qui influencent l'efficacité de *B. subtilis* à s'établir, persister et compétitionner sur les racines de plantes. Afin de valider les hypothèses posées précédemment, nous avons émis les objectifs spécifiques suivants :

- 1) Caractériser l'activité métabolique de *B. subtilis* en présence d'*A. thaliana*.
  - a. Développer un système hydroponique pour étudier la dynamique de formation des spores sur la plante en conditions stériles ;
  - b. Évaluer l'influence des histidines kinases et des récepteurs de germination sur la formation et la levée de la dormance cellulaire ;
  - c. Déterminer la transposition des résultats obtenus *in vitro* en effectuant la dynamique de formation des spores en terre (en condition non stérile) ;
  - d. Évaluer l'influence des exsudats racinaires sur la formation des spores ;
  - e. Établir un système permettant de séparer les plantes et les bactéries afin de vérifier l'importance du contact physique entre ces derniers dans la formation des spores ;
  
- 2) Déterminer les sites de colonisation préférentielle de *B. subtilis* sur la plante en utilisant les spores comme marqueur d'activité métabolique sur des espèces de plantes différentes.
  - a. Déterminer les cinétiques de population bactérienne et quantifier les spores sur deux espèces de plantes différentes et sur trois sites différents (Feuille, racine et sol) : *Echinacea purpurea* cultivar Salsa red, *Echinacea*

*purpurea* cultivar Fatal attraction et *Lavandula angustifolia* cultivar Hidecote blue.

- 3) Déterminer le type de relation qui existe entre *P. fluorescens*, *P. capeferrum* et *P. protegens* avec *B. subtilis*.
  - a. Évaluer par dénombrement bactérien la quantité de *B. subtilis* en présence de bactéries compétitrices sur la plante ;
  - b. Effectuer des essais de compétition sur milieu solide entre *B. subtilis* et trois *Pseudomonas spp.*
  
- 4) Déterminer les rôles écologiques et physiologiques de la formation du complexe pulcherrimine.
  - a. Évaluer l'effet et le rôle de la pulcherrimine sur la survie et la formation de biofilm de *B. subtilis* en présence de *P. protegens* ;
  - b. Déterminer l'impact de la formation de la pulcherrimine dans l'acquisition du Fe ;
  - c. Purifier la pulcherrimine et étudier les mécanismes de récupération du complexe.

## CHAPITRE 2

### ***ARABIDOPSIS THALIANA* SEEDLINGS INFLUENCE *BACILLUS* *SUBTILIS* SPORE FORMATION**

#### 2.1 Introduction

##### 2.1.1 Pertinence

De nombreuses études sur les interactions plantes – *B. subtilis*, spécifiquement au niveau de la racine, ont porté sur la colonisation et la formation d'un biofilm, soit le premier et second stade de développement de *B. subtilis*. Néanmoins, seulement une poignée d'études ont rapporté la présence d'endospores sur la plante, accentuant l'importance d'approfondir nos connaissances sur ce troisième stade de développement totalement négligé. Avec la mise en place d'un système de culture hydroponique, nous avons effectué des cinétiques de formation de spores sur racine en conditions stériles (système hydroponique) et non stériles (en sol). Nous avons montré que les spores germent conjointement avec la graine et les cellules ne restent actives que sur une courte période (moins de 9 jours) avant que la population soit dominée à nouveau par des cellules dormantes.

Ensuite, bien que les récepteurs de germination et les protéines histidines kinases contrôlant les stades de développement soient bien caractérisés *in vitro*, nous les avons caractérisés *in planta*. KinA et KinB sont les protéines impliquées dans le déclenchement du processus de sporulation *in vitro* et les résultats obtenus *in planta* reflètent ceux *in vitro*. Pour les récepteurs responsables de la germination des spores sur les graines, GerK est celui qui lève la dormance des endospores. Ensuite, nous avons effectué deux analyses complémentaires pour mettre en évidence que la

carence en carbone et en azote ne sont pas responsables de l'induction de la sporulation. Alternativement, une expérience de complémentation avec le milieu résiduel a révélé que la plante sécrète, lors d'un contact des bactéries de différentes espèces, des molécules induisent la formation de spores. Cette signalisation implique potentiellement le système immunitaire de la plante.

Cette étude a d'importantes implications pour l'agriculture biologique, non seulement parce qu'elle a caractérisé la formation de spores sur la plante, mais surtout car elle démontre que l'application des spores sur la graine comme technique d'ensemencement ne semble pas supporter une croissance active des cellules à long terme. Ces données laissent sous-entendre qu'une application répétée des spores serait nécessaire pour maintenir une population active.

### 2.1.2 Apport des auteurs

L'idée originale a été proposée par Pascale B. Beauregard au début de mes études graduées et j'ai, conjointement avec Pascale B. Beauregard conceptualisé les expériences au courant de l'étude.

J'ai produit toutes les figures de l'article et ai fait les analyses statistiques. Pascale B. Beauregard a rédigé la première version de l'article et j'ai édité les versions subséquentes. Alain Lavigueur, Alexandre Maréchal, Sébastien Rodrigue, Peter Moffett et Vincent Burrus ont relu et critiqué le manuscrit.

### 2.1.3 Référence

**Charron-Lamoureux V & Beauregard PB.** (2019) *Arabidopsis thaliana* Seedlings Influence *Bacillus subtilis* Spore Formation. *MPMI*. 32 (9), 1188-1195.

Mots clés: Plantes, *Bacillus*, exsudats racinaires, spores

## 2.2 Article

### 2.2.1 Page titre

#### ***Arabidopsis thaliana* Seedlings Influence *Bacillus subtilis* Spore Formation**

### 2.2.2 Abstract

*Bacillus subtilis* is a Gram-positive plant-growth-promoting rhizobacterium exerting many beneficial effects on plant health. Because they secrete antimicrobial compounds and elicit induced systemic resistance, *B. subtilis* and phylogenetically related species are of particular interest as antifungals in organic agriculture. These bacteria are also known for their capacity to differentiate phenotypically into endospores able to withstand many environmental stresses. However, although *B. subtilis* is often inoculated on plants as spores, dynamics of germination and sporulation on roots remain unexplored. Using a hydroponic culture system and a soil system for *Arabidopsis thaliana*, we observed that *B. subtilis* spores germinate rapidly on contact with plants. However, the vegetative cells are abundant on roots for only a few days before reversing back to spores. We observed that the germinant receptor GerK and sporulation kinases KinA and KinB identified in vitro control sporulation dynamics on plants. Surprisingly, when plants are inoculated with *B. subtilis*, free-living cells sporulate more rapidly than plant-associated cells. However, direct contact between plant and bacteria is required for the induction of sporulation in the surrounding *B. subtilis*. This study has fundamental implications for our understanding of interactions between *Bacillus* spp. and plants, and particularly for a more efficient usage of *B. subtilis* as a biofertilizer or biofungicide.



### 2.2.3 Introduction

The soil fraction influenced by root exudates, the rhizosphere, contains an abundant microbial diversity (Hartmann et al. 2008). Up to 30% of carbon fixed by young plants is released by root exudates as a wide range of compounds, including organic acids, simple and complex sugars, and amino acids (Badri and Vivanco 2009; Mönchgesang et al. 2016). These root-secreted molecules contribute to the formation of a rhizobiome by attracting microorganisms and serving as nutrients (Lareen et al. 2016). Several bacteria living in the rhizosphere can provide beneficial activities for plants by improving growth and metabolism, increasing nutrient bioavailability (e.g., phosphorus solubilization), and contributing to plant defense against various pathogens (Niu et al. 2011; Vacheron et al. 2013; Vejan et al. 2016; Xie et al. 2018). Although these plant-growth-promoting rhizobacteria (PGPRs) include many species from various genera (Sivasakthi et al. 2014; Vacheron et al. 2013), research is currently focused on certain phylogenetically related members showing high potential as biofertilizers and biofungicides.

*Bacillus subtilis* is a Gram-positive bacterium commonly associated with plant roots. It can secrete a wide array of compounds, including plant growth phytohormones, volatile compounds, as well as antimicrobials. *Bacillus* spp. can also trigger induced systemic plant resistance (Arkhipova et al. 2005; Lugtenberg and Kamilova 2009). Because of these multiple beneficial activities, *B. subtilis* and the closely related *B. amyloliquefaciens* are used worldwide as biofertilizers and biofungicides (Beneduzi et al. 2012; Lugtenberg and Kamilova 2009; Vejan et al. 2016).

*Bacillus* spp. are also of particular commercial interest due to their capacity to differentiate into metabolically dormant and highly resistant endospores (referred to as spores in this article), which are used to formulate stable products (Setlow 2006; Tan and Ramamurthi 2014). Genetic tractability of *B. subtilis* allowed comprehensive

studies of sporulation, which is triggered in vitro by reduced nutrients levels in the environment and high cell density (Driks 1999; Meeske et al. 2016). These environmental cues activate one or many of the five histidine kinases (KinA to KinE) which, following a phosphorylation cascade, phosphorylate the master regulator Spo0A (Higgins and Dworkin 2012; McLoon et al. 2011). High cellular levels of Spo0A~P activate a  $\sigma$  cascade which, in turn, controls the formation and maturation of the endospore (Aguilar et al. 2010; Liu et al. 2018; Meeske et al. 2016). Among the histidine kinases mentioned above, KinA and KinB have been described as the major proteins involved in sporulation in vitro (Eswaramoorthy et al. 2010; Tojo et al. 2013). Nutrient and nonnutrient molecules can serve as germinants to trigger the reversion of *B. subtilis* endospores back to vegetative cells (Setlow 2014). Nutrients, including L-valine, L-alanine, fructose, and glucose, are sensed by one or many of the five germinant receptors encoded by tricistronic operons (Igarashi and Setlow 2006; Ramírez-Guadiana et al. 2017). Three major *ger* operons (*gerA*, *gerB*, and *gerK*) have been well characterized and two minors ones (*ynf* and *yfk*) have been found to be not critical for germination of spores in vitro. Of note, some studies have suggested that GerK is necessary for the other germinant receptors to respond to their germinants and cogermnants (Atluri et al. 2005; Igarashi and Setlow 2006).

In addition to sporulation, Spo0A~P controls the emergence of other phenotypically different cell types in *B. subtilis*. Absence or low levels of cellular Spo0A~P allow the expression of mobility-related genes, while intermediate phosphorylation triggers biofilm formation by activating the expression of matrix genes (Beauregard et al. 2013; Kolodkin-Gal et al. 2013; Mielich-Süss and Lopez 2015). Recently, others and we have shown this differentiation process to be important for colonization of *Arabidopsis thaliana* roots. Indeed, swimming motility and chemotaxis are required for early colonization of roots and for efficient plant defense against *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000 (Allard-Massicotte et al. 2016). Biofilm formation, which can be induced by plant cell-wall components (pectin and arabinogalactan) or root-

secreted molecules (malate), is necessary for the establishment of cells on roots (Beauregard et al. 2013; Rudrappa et al. 2008).

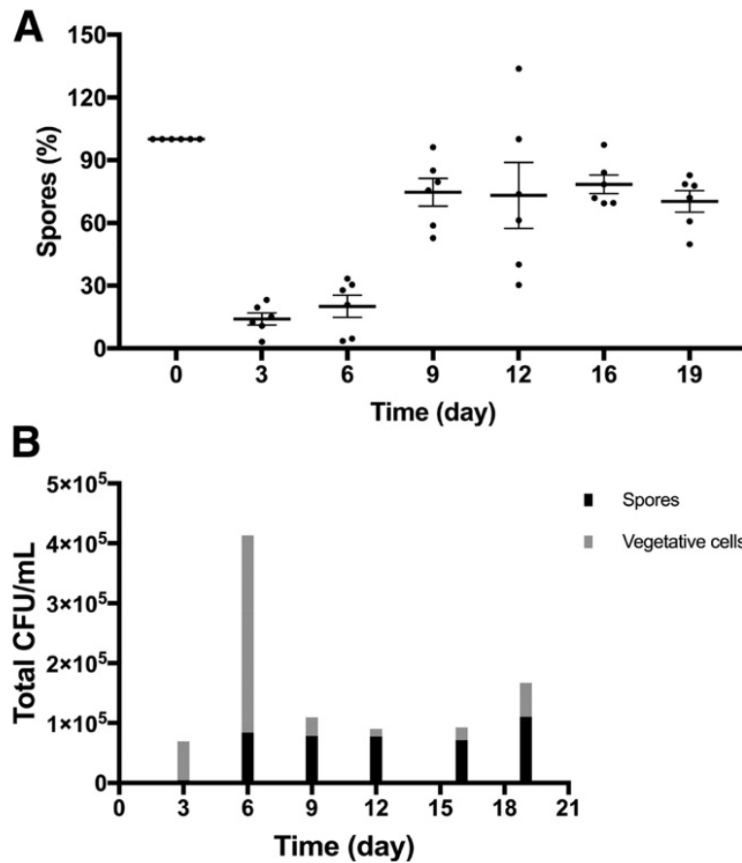
However, despite their importance in biofungicide formulation and their abundance in the natural environment (Bishnoi et al. 2015; Chen et al. 2018; Ongena and Jacques 2008), the occurrence of *Bacillus* spores on plant root has been rarely studied. This question is of central importance because many plant beneficial effects provided by *Bacillus* spp. such as volatile and antimicrobials secretion require an active metabolism. Here, we adapted a hydroponic system allowing us to study *B. subtilis* sporulation on *A. thaliana* for extended incubation periods. We observed that, although *B. subtilis* germinates concomitantly to seedling emergence, it rapidly sporulates on roots and stays dormant, which might have important implications for its efficacy as a biopesticide. Importantly, *A. thaliana* seems to induce sporulation of surrounding *B. subtilis* but only when its roots are in direct interaction with bacteria, showing that the plant can directly modulate dormancy of bacteria surrounding it.

### 2.2.3 Results

#### 2.3.3.1 *B. subtilis* sporulation dynamic over time.

One of the main advantages of using *Bacillus* spp. as biofertilizers and biopesticides is spore formation, which allows easier formulation and application of stable products. Plants secrete many molecules serving as nutrient supply for microorganisms through their root exudates, likely influencing sporulation and germination of *B. subtilis* (Lugtenberg and Kamilova 2009). Consequently, we decided to study the sporulation dynamic of *B. subtilis* NCIB3610 in contact with *A. thaliana* ecotype Col-0 for 19 days and 9 days in a hydroponic system and in a soil system, respectively. In the first 3 days in the hydroponic system, seed and spores germinated concomitantly, and approximately 80 to 90% of the cells stayed in a vegetative state on the roots for several

days (Figure 2.1A.). This period also allowed significant multiplication of the bacteria, because the highest numbers of bacteria on roots was reached by day 6 (Figure 2.1B.). Importantly, half-strength Murashige and Skoog basal medium (one-half MS) with sucrose alone had no impact on germination of spores (Supplementary Figure S2.1.). By day 9, 70% of cells were spores and this level stayed stable for the following 2 weeks (Figure 2.1A.). Overall, the population of bacteria on the plants underwent two distinct phases on the roots. The first few days, cells germinated and multiplied and, after cells sporulated, sustained over 70% of spores over time. The dynamic of sporulation in soil system is representative of the hydroponic system because spores on seed germinate concomitantly (Supplementary Figure S2.2.). By day 5, more than 80% of cells were spores and remained stable until day 9. Interestingly, over time on seedlings in a hydroponic system and in a soil system, the dormant state is dominant.

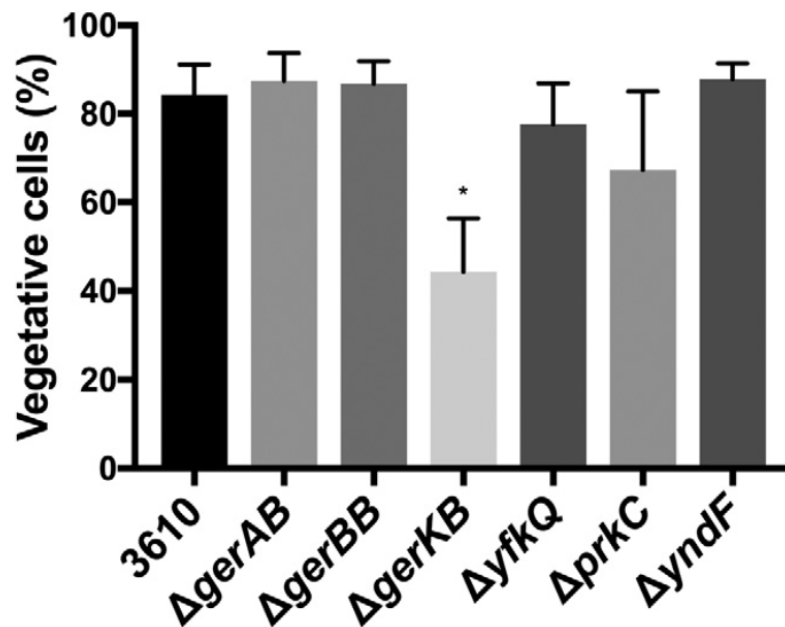


**Figure 2.1.** *Bacillus subtilis* sporulation dynamic on roots in a hydroponic culture over time.

**A**, *Arabidopsis thaliana* seed coated by spores were incubated in the dark for 3 days at room temperature on disks floating on half-strength Murashige and Skoog basal medium. Seedlings were harvested and sonicated to assess the percentage of spores on total CFU at different days (3, 6, 9, 12, 16, and 19). Results shown are representative of at least three independent experiments and error bars represent the standard error of the mean. **B**, Total amount of bacteria was shown as number of spores (CFU per milliliter) and number of vegetative cells (CFU per milliliter) over time.

### 2.3.3.2 *GerK receptor is responsible for an efficient germination of the spores.*

Genetic processes leading to germination and sporulation in artificial media are well described in the literature (Higgins and Dworkin 2012; Setlow 2014). To validate the importance of the germination and sporulation pathways identified in vitro, we used deletion mutants to further characterize these two processes when they occur on roots. To determine which germinant receptors are activated after seed inoculation, we first used strains deleted for the B subunit genes of the three well-characterized germinant receptors operons *gerA*, *gerB*, and *gerK* ( $\Delta gerAB$ ,  $\Delta gerBB$ , and  $\Delta gerKB$ ), or for a gene in the two minor germinant operons *ynd* and *yfk* ( $\Delta yndF$  and  $\Delta yfkQ$ ). We also used a strain harboring a *prkC* deletion ( $\Delta prkC$ ), which encodes for a protein involved in the germination of spores when exposed to peptidoglycan (Shah et al. 2008). Seeds were inoculated with spores of each mutant, and spore level was evaluated after 4 days in one-half MS medium supplemented with 2% sucrose. The wild type and most mutants germinated at high levels, because approximately 80% of their population was in a vegetative state 4 days postinoculation (Figure 2.1.). However, the absence of GerK significantly impaired germination and caused a significant decrease in the level of vegetative cells compared with the wild-type strain (Figure 2.2.).



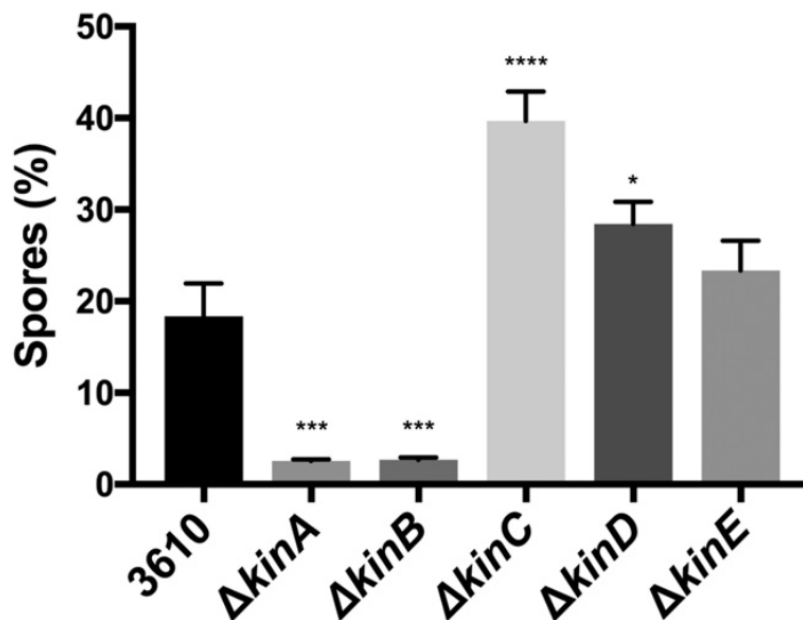
**Figure 2.2. GerK receptor is responsible for an efficient germination of the spores.**

Seeds were coated with different germinant receptors mutants ( $\Delta gerAB$ ,  $\Delta gerBB$ ,  $\Delta gerKB$ ,  $\Delta yndF$ ,  $\Delta yfkQ$ , and  $\Delta prkC$ ). At day 4, the percentage of vegetative cells on total CFU was evaluated. Results shown are representative of at least three independent experiments and error bars represent the standard error of the mean. Statistical analysis shows a significant decrease of spore germination of the mutant  $\Delta gerKB$  (one-way analysis of variance, \* indicates  $P < 0.05$ ).

### 2.3.3.3 *KinA and KinB are essential genes for sporulation in contact with A. thaliana.*

KinA and KinB have been previously described as the major histidine kinases involved in sporulation in vitro (Dartois et al. 1996; Tojo et al. 2013). To evaluate their importance on roots, we inoculated roots with single deletion mutants of all histidine kinases ( $\Delta kinA$ ,

$\Delta kinB$ ,  $\Delta kinC$ ,  $\Delta kinD$ , and  $\Delta kinE$ ) in vegetative state and measured spore level of root-associated cells after 30 h. After that time, wild-type cells displayed a percentage of spores close to 20%, which allowed us to clearly distinguish variations in spore levels. Similarly to what was observed in vitro, absence of either KinA and KinB led to very low sporulation, showing that both were required for efficient sporulation (Figure 2.3.). Surprisingly,  $\Delta kinC$  and  $\Delta kinD$  mutants showed significantly higher sporulation than wild-type cells. This result is in accordance with the observation that, under specific conditions, KinC and KinD could act as phosphatases to Spo0A, thereby reducing sporulation levels (Aguilar et al. 2010).



**Figure 2.3. KinA and KinB are essential for spore formation in contact with *Arabidopsis thaliana*.**

Single deletion mutants for all five histidine kinases were inoculated with *A. thaliana* Col-0 for 30 h. Cells attached to seedlings were harvested and sonicated to evaluate the percentage of spores on total CFU. Results shown are representative of at least three independent experiments and

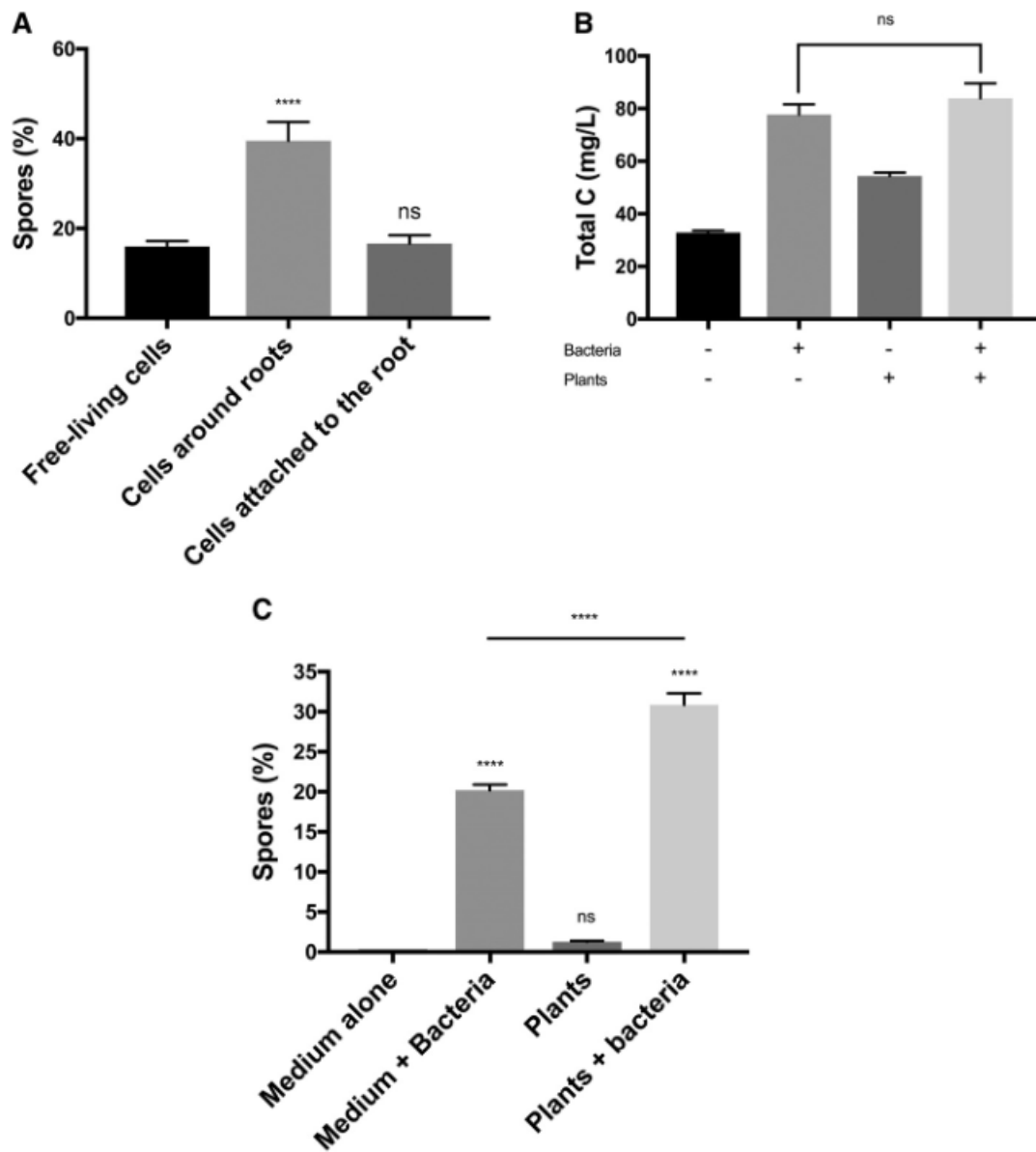


error bars represent the standard error of the mean. Statistical analysis showed a significant decrease in percentage of spore of  $\Delta kinA$  and  $\Delta kinB$  and a significant increase for  $\Delta kinC$  and  $\Delta kinD$  while  $\Delta kinE$  showed no significant difference (one-way analysis of variance, \*, \*\*\*, and \*\*\*\* indicate  $P < 0.05$ , 0.001, and 0.0001, respectively).

#### 2.3.3.4 *The presence of plants influences the sporulation of B. subtilis.*

Because sporulation is mostly triggered by a nutrient-depletion signal, carbon compounds secreted by *A. thaliana* roots might strongly influence *B. subtilis* sporulation. Thus, we evaluated the impact of root exudates by inoculating *B. subtilis* at a final optical density (OD) of 0.02 in one-half MS without the addition of a carbon source and assessed the spore level of bacteria 30 h postinoculation. Intriguingly, whereas spore level of bacteria in the medium alone (without plants) and on the root was fairly low, we observed a significantly higher level of spore formation in the free-living bacterial population surrounding the plant (Figure 2.4A.). One explanation might be that bacteria attached to the root depleted all nutrients, leaving no nutrients to the free-living bacteria, inducing them to rapidly sporulate. We examined this hypothesis by quantifying the carbon content in the medium alone; the medium with bacteria or with plants, respectively, alone; and with both bacteria and plants. After a period of 36 h, we used a TOC-V carbon analyzer and observed that the presence of seedlings in the medium slightly increased the total amount of carbon compounds, while addition of bacteria doubled it (Figure 2.4B.). Thus, in these conditions, the higher sporulation level observed for *B. subtilis* in the presence of plants was not due to carbon depletion. We then evaluated whether sporulation might be triggered by the depletion of another type of compound such as a nitrogen source. To do so, spent media obtained under the same conditions were concentrated twofold by evaporation using a vacufuge and the same volume of one-half MS (ratio 1:1) was added back to the concentrated spent media. We reasoned that, after this treatment, nitrogen levels would be restored to at

least 1/4 MS levels if the bacteria had depleted the nitrogen source present in the medium. After an incubation period of 36 h, we observed that, despite the addition of one-half MS, these media showed similar trend in sporulation induction (Figure 2.4C.), suggesting that sporulation is triggered not by nutrient depletion but by a specific factor present when plants are combined with bacteria.



**Figure 2.4. *Arabidopsis thaliana* Col-0 influences *Bacillus subtilis* sporulation.**

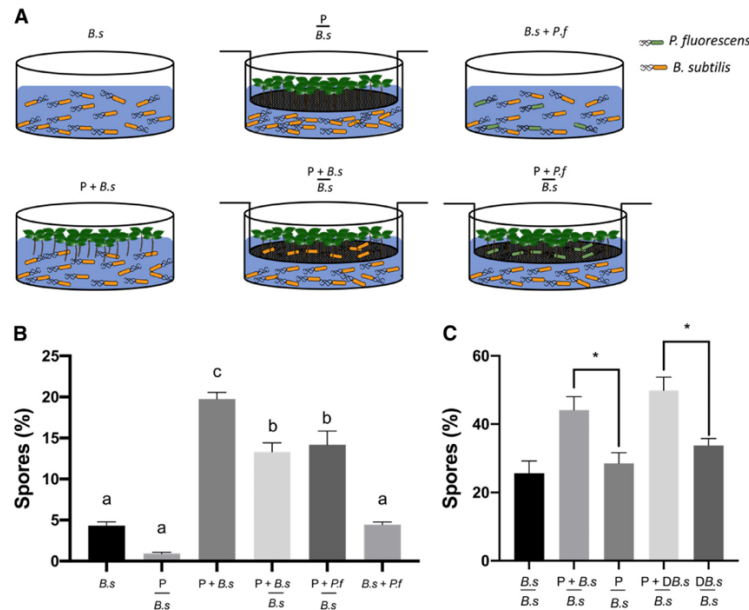
**A**, *B. subtilis* wild-type cells were inoculated with or without 7-day-old seedlings in half-strength Murashige and Skoog basal medium (one-half MS) and incubated for 30 h. Plants were sonicated to remove all bacteria attached and the percentage of spores on total CFU was assessed. Results shown are representative of at least three independent

experiments and error bars represent the standard error of the mean (SEM). Statistical analysis showed a significant increase in spore level of the bacteria neighboring the plants but not the bacteria that were attached to the root (one-way analysis of variance, \*\*\*\* indicate  $P < 0.0001$  and ns = not significant). **B**, Total carbon in the medium with and without the addition of plants and bacteria after 36 h of incubation in the growth chamber was quantified. Statistical analysis revealed no significant difference between the condition with the addition of bacteria (ns = not significant). Assays were performed in three independent biological replicates and error bars represent the SEM. **C**, Bacteria were cultivated in one-half MS with and without the plant for 30 h in the growth chamber. The spent medium of each condition was concentrated 2× and then complemented at a ratio of 1:1 with new fresh medium (one-half MS) before inoculation and incubation for 30 h. The percentage of spores on total CFU was then assessed. Results shown are representative of at least three independent experiments and error bars represent the SEM. Statistical analysis reveals a significant increase in the sporulation level of medium incubated with bacteria, plants, and both plants and bacteria (one-way analysis of variance, \*\*\*\* indicate  $P < 0.0001$  and ns = not significant).

#### 2.3.3.5 *Direct contact between plants and bacteria is required to induce B. subtilis sporulation.*

Association of bacteria with roots leads to modulation in the composition of root exudates (Badri et al. 2008; Matilla et al. 2010). To examine whether “naive” root exudates could induce sporulation, we physically separated 7-day-old seedlings from the bacteria using a cell culture insert. Interestingly, when plants were not directly in contact with *B. subtilis*, we did not observe a variation in the spore level when compared

with medium alone (Figure 2.5B., compare P/B versus B). Using the same cell culture insert, we then inoculated bacteria inside the insert. We observed that top inoculation of the seedlings with either *B. subtilis* or *P. fluorescens* WCS365, another PGPR, increased spore level of *B. subtilis* cells located under the cell culture insert (Figure 2.5B.). Importantly, combination of *P. fluorescens* with *B. subtilis* did not increase sporulation when compared with *B. subtilis* alone. To further distinguish whether nutrient deprivation or a bioactive molecule secreted by the plants would be responsible for inducing sporulation of cells under the insert, we added dead *B. subtilis* in the culture insert with plants. Because we are performing experiments in shaking conditions, cell debris and seedling roots will be put in contact randomly. Importantly, we observed that dead *B. subtilis* induced sporulation at a level similar to live bacteria (Figure 2.5C.). Taken together, our results indicate that contact between seedlings and bacteria triggers an increase of sporulation of the surrounding cells.



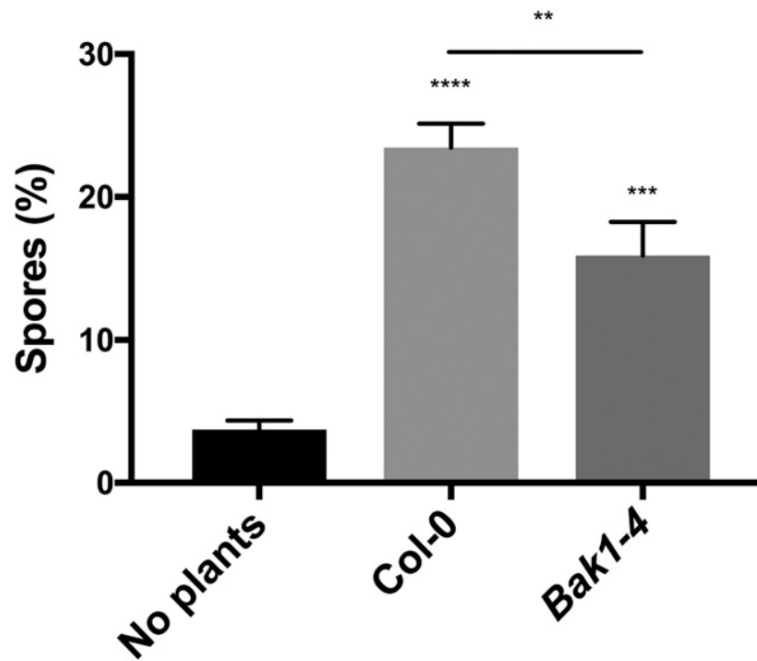
**Figure 2.5. Direct contact between *Arabidopsis thaliana* and *Bacillus subtilis* is required to induce sporulation.**

**A**, Representation of the experimental conditions. A cell culture insert was used to separate plants from bacteria. Wild-type cells were inoculated outside the cell culture insert and in direct contact or not with the plant for 30 h. **B**, Spore level of *B. subtilis* cells in the medium in absence of a cell culture insert or under the cell culture insert was evaluated. Ratios indicate the presence of culture insert; *B. subtilis* (*B.s*) and *P. fluorescens* (*P.f*) indicate inoculation with plants (*P*). Bars with different letters are significantly different at  $P < 0.01$  according to analysis of variance and Tukey's multiple comparisons test. **C**, Spore percentage of *B. subtilis* cells in the medium in absence of a cell culture insert or under the cell culture insert was evaluated. Ratios indicate the presence of culture insert; *B. subtilis* (*B.s*) and dead *B. subtilis* (*DB.s*) indicate inoculation with plants (*P*). Results shown are representative of at least three independent experiments and error bars represent the standard error of the mean. Statistical analysis showed an increase of the spore level of *B. subtilis* under the insert when plants were in direct contact with either plant-growth-promoting rhizobacteria strains (one-way analysis of variance, one asterisk (\*) indicates  $P < 0.05$ , respectively; ns = not significant).

#### 2.3.3.6 *Bak1* is involved in the induction of the sporulation level of *B. subtilis*.

Our results suggest that direct contact between seedlings and PGPRs influence root exudates sufficiently to trigger *B. subtilis* sporulation. Thus, it is likely that the plant immune system plays an active role in that process. To evaluate this hypothesis, we used an *A. thaliana bak1-4* mutant, which is involved in the innate immunity response (pattern-triggered immunity) and regulates positively the Brassinosteroid-dependant plant growth pathway (Yang et al. 2011). When inoculated with *B. subtilis*, the *bak1-4* seedlings did not influence sporulation of the surrounding bacteria when compared with

Col-0 seedlings (Figure 2.6), further supporting the hypothesis that a variation of root exudates following bacterial contact is responsible for higher levels of *B. subtilis* spores.



**Figure 2.6. Bak1 is involved in the induction of the sporulation level of *Bacillus subtilis*.**

*B. subtilis* was inoculated with 7-day-old seedlings (*bak1-4* mutant) in six-well plates containing half-strength Murashige and Skoog basal medium in a growth chamber. The percentage of spore surrounding roots was assessed 30 h post inoculation. Results shown are representative of at least three independent experiments and error bars represent the standard error of the mean. Statistical analysis showed a significant increase in the spore level when bacteria were in the presence of *Arabidopsis thaliana* Col-0 and the *bak1-4* mutant (one-way analysis of variance, \*\*, \*\*\*, and \*\*\*\* indicate  $P < 0.01$ , 0.001, and 0.0001, respectively).

#### 2.3.4 DISCUSSION

Despite *B. subtilis* importance as a commercial biofertilizer and biofungicide, its sporulation and dormancy on plant roots has remained poorly characterized. Here, we report that, in poor liquid medium and in soil systems, seedlings were able to trigger spore germination but that duration of this vegetative state was limited and *B. subtilis* cells rapidly sporulated. These results provide important information to better understand the efficacy of these bacteria on plants, because many activities (e.g., antimicrobial secretion and iron and phosphate solubilization) require an active metabolism. Additionally, bacterial division is likely a prerequisite to strong colonization and multiplication of the PGPRs on plants. Our results obtained in both hydroponic systems and soil systems are in concordance with other studies that have shown that, in agricultural conditions, *Bacillus* spp. cell number does not increase after application on plants (Crane et al. 2013; Mendis et al. 2018; Zeriuoh et al. 2014). Abundance of *B. subtilis* spores could explain this lack of bacterial multiplication on plants.

Genetic characterization showed that GerK as well as KinA and KinB are the major signaling proteins involved in germination and sporulation, respectively. These results are consistent with those obtained using artificial media, showing that, despite important environmental differences, these proteins are central for these two processes. GerK is a germinant receptor required for the response to glucose, fructose, aspartate, and KCl (Atluri et al. 2005), which are likely present in *A. thaliana* seedling exudates (Badri and Vivanco 2009; Chaparro et al. 2013). The strong effect observed with the lack of this receptor can also be explained by its requirement for the full functionality of both GerA and GerB receptors (Igarashi and Setlow 2006). KinA and KinB, an intracellular and a membrane-bound signaling kinase, respectively, have been extensively described in the literature as the main trigger of sporulation (Tojo et al. 2013). Although KinA is being generally recognized as the main sporulation kinase, the relative importance of each appears to vary according to experimental conditions (Liu



et al. 2018). Our study confirms that, when the bacteria is present of the roots of a natural host, both kinases may be equally necessary for sporulation because a single deletion mutant of either drastically decreased spore levels.

In our system, we observed that *B. subtilis* cells surrounding roots sporulated faster than *B. subtilis* cells in direct contact with seedlings or in the absence of plants. We considered that cells on the roots might consume most nutrients secreted by the plant, thus indirectly stimulating sporulation of the planktonic cells by causing a nutrient depletion. However, carbon quantification, media complementation, and dead *B. subtilis* assays did not support this hypothesis (Figures 2.4B. and C and 2.5C, respectively). An alternative hypothesis is that *A. thaliana* might secrete a factor triggering sporulation when it is in the presence of bacteria. This idea is supported by the fact that seedling inoculations with either *B. subtilis*, *P. fluorescens*, or dead *B. subtilis* promoted sporulation of surrounding *B. subtilis* cells. Also, the *A. thaliana* mutant for *bak1-4*, involved in modulating plant response to microbe-associated molecular patterns (Li et al. 2016; Yasuda et al. 2017), also had a lower impact than Col-0 plant when inoculated with *B. subtilis*. Taken together, these results point toward a seedling-mediated effect on *B. subtilis* sporulation. Interestingly, long-term incubation of *A. thaliana* seedlings inoculated with vegetative *B. subtilis* caused browning and stopped growth of the roots (Supplementary Figure S2.3), suggesting a deleterious effect of these bacteria when present in excessive amounts and in a vegetative state. Thus, induction of sporulation by *A. thaliana* seedlings might be a defense mechanism triggering dormancy until the plant is better able to host *B. subtilis* vegetative cells.

Despite a wide usage of spore-forming bacteria in agriculture, our results highlight the need to gain further knowledge about dormancy and germination of *Bacillus* spp. on plants. Indeed, *B. subtilis* might be metabolically active on plants for only a short timeframe, restricting the duration and levels of their beneficial activities. Thus, further research is needed to better evaluate the extent of sporulation and germination

dynamics under agricultural conditions. Reactivation of spores on plants is also of great interest and might provide a path to increase *Bacillus* spp. efficacy, as previously suggested (Crane et al. 2013). Finally, our results strongly suggest that, in response to PGPRs, *A. thaliana* seedlings produce exudates that favor sporulation of neighboring *B. subtilis*. This observation confirms the complex interplay between *Bacillus* differentiation and *A. thaliana*, as well as the importance of better understanding these models to further improve our comprehension and use of beneficial bacteria in agriculture.

## 2.2.5 Materials and methods

### 2.2.5.1 *Strains, media, and culture conditions.*

All strains used in this study are listed in Supplementary Table S2.1. *B. subtilis* NCIB3610 was used as the wild-type strain, and provided the genetic background for all other strains. For routine growth, cells were cultivated in a shaker with 3 ml of Luria-Bertani (LB) medium (1% tryptone, 0.5% yeast extract, and 0.5% NaCl) at 37°C. For all sporulation and germination experiments, the medium used was one-half MS (MP Biomedicals). *A. thaliana* ecotype Columbia-0 was used in this study, and *bak1-4* mutants were a kind gift from Dr. Kamal Bouarab (Université de Sherbrooke). *A. thaliana* seed were surface sterilized with 70% ethanol followed by 0.3% (vol/vol) sodium hypochlorite, rinsed three times with sterile distilled water, and plated on Murashige and Skoog 0.8% agar supplemented with 0.05% glucose. Plates were incubated in a growth chamber at 25 and 20°C with a photoperiod of 12 h.

#### 2.2.5.2 *Strain construction.*

Most strains were generated by transferring genetic construction present in domesticated strains in NCIB3610, using SPP1-mediated generalized transduction (Yasbin and Young 1974).

#### 2.2.5.3 *Dynamic of germination and sporulation.*

Bacteria were cultivated overnight in Difco sporulation medium (Nicholson and Setlow 1990) to induce spore formation. A 5-ml culture aliquot was treated for 20 min at 80°C, and cells were resuspended in phosphate-buffered saline (PBS) to a final OD at 600 nm (OD<sub>600</sub>) of 4. Sterilized seed, preincubated in 0.1% agar for 4 to 7 days at 4°C, were added to the bacteria and incubated for 30 min at room temperature. In the hydroponic system, seed were transferred with 2 µl of bacterial solution on a Teflon mesh disk (number 1100t41; McMaster-Carr) floating on 0.5 ml of one-half MS supplemented with 2% sucrose in 24-well plates. This technique, adapted from (Haney et al. 2015), allowed aerial parts of plants to avoid liquid contact. After etiolating for 3 days in the dark, plants and mesh were transferred to another 24-well plate with 1 ml of one-half MS without sucrose. The abundance of spores was assessed after the transfer, as described below. In the soil system, seed coated by spores were directly put in soil in the growth chamber covered by a plastic pellicle to increase the humidity. For the germinant receptors assay, plants and mesh were transferred to another 24-well plate with 0.5 ml of one-half MS without sucrose and the spore level was evaluated after 4 days.

#### 2.2.5.4 *Spore quantification.*

Seven-day-old seedlings were transferred into six-well culture plates containing 6 ml of one-half MS at a ratio of 1 plant per 200 µl, and alive and dead *B. subtilis* in exponential

phase were added to the medium surrounding the plants to a final OD<sub>600</sub> of 0.02. For dead bacteria, a *B. subtilis sigF* mutant (background NCIB3610) was treated at 80°C to kill cells. When needed, plants were separated from the bacteria using a cell culture insert (pore size: 0.4 µm) propped up with wooden sticks (Puritan). Plant and bacteria were incubated in the growth chamber at 25 and 20°C with a photoperiod of 12 h and shaking at 90 rpm. Incubation time is indicated in Figures 1, 2, 3, 4, 5, and 6. To evaluate sporulation levels, samples were sonicated using a Q125 ultrasonic disruptor with a 3-mm probe set at 30% amplitude for 10 pulses (1-s pulse and 1-s rest time). The samples were serially diluted in PBS and plated on LB 1.5% agar before and after a 20-min treatment at 80°C to kill all vegetative cells. Percentage of sporulation was calculated using CFU per milliliter after and before treatment.

#### 2.2.5.5 *Spent medium and total carbon quantification.*

Seven-day-old seedlings were transferred into six-well culture plates containing 6 ml of one-half MS at a ratio of 1 plant per 200 µl. Bacteria in exponential phase were added to the medium surrounding the plants to a final OD<sub>600</sub> of 0.02. After 36 h of incubation, the medium was filter sterilized using a 0.22-µm filter. For total (inorganic and organic) carbon quantification, the medium was analyzed using a Shimadzu TOC-V wp with an ASI-V autosampler. Samples were injected with an oxidizing reagent composed of sodium persulfate and phosphoric acid in the reactor (UV lamp and heater) heated to 80°C. The sample was oxidized and decomposed to carbon dioxide in the reactor, and detected with an infrared detector. For the spent medium experiment, samples were prepared as described earlier. Then, 4 ml of sample was filtered and concentrated to 2 ml using a vacufuge. Then, 2 ml of fresh one-half MS was added back to complete the original volume (4 ml) before reinoculation with bacteria at OD<sub>600</sub> of 0.02 for 36 h.

### 2.2.6 Acknowledgments

We thank K. Bouarab for his kind gift of *A. thaliana bak1-4* seed; O. Savary for the total carbon quantification experiment; D. Garneau for help with the stereomicroscope; and P. Moffett, V. Burrus, S. Rodrigue, and A. Lavigueur for their critical comments on this manuscript.

### 2.2.7 References

Aguilar, C., Vlamakis, H., Guzman, A., Losick, R., and Kolter, R. 2010. KinD is a checkpoint protein linking spore formation to extracellular-matrix production in *Bacillus subtilis* biofilms. *MBio*. 1:e00035-10

Allard-Massicotte, R., Tessier, L., Lécuyer, F., Lakshmanan, V., and Lucier, J. 2016. *Bacillus subtilis* early colonization of *Arabidopsis thaliana* roots. *MBio*. 7:e01664-16

Arkhipova, T. N., Veselov, S. U., Melentiev, A. I., Martynenko, E. V, and Kudoyarova, G. R. 2005. Ability of bacterium *Bacillus subtilis* to produce cytokinins and to influence the growth and endogenous hormone content of lettuce plants. *Plant Soil*. 272:201–209

Atluri, S., Ragkousi, K., Cortezzo, D. E., and Setlow, P. 2006. Cooperativity between different nutrient receptors in germination of spores of *Bacillus subtilis* and reduction of this cooperativity by alterations in the GerB receptor. *J. Bacteriol*. 188:28 LP-36

Badri, D. V., Loyola-Vargas, V. M., Du, J., Stermitz, F. R., Broeckling, C. D., Iglesias-Andreu, L., and Vivanco, J. M. 2008. Transcriptome analysis of *Arabidopsis* roots treated with signaling compounds: A focus on signal transduction, metabolic regulation and secretion. *New Phytol*. 179:209–223

Badri, D. V., and Vivanco, J. M. 2008. Regulation and function of root exudates. *Plant. Cell Environ*. 32:666–81

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

- Beneduzi, A., Ambrosini, A., and Passaglia, L. M. P. 2012. Plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR): Their potential as antagonists and biocontrol agents. *Genet. Mol. Biol.* 35:1044–1051
- Bishnoi, U., Polson, S., Sherrier, D., and Bais, H. P. 2015. Draft genome sequence of a natural root isolate, *Bacillus subtilis* UD1022, a potential plant growth-promoting biocontrol agent. *Genome Announc.* 3:e00696-15
- Chaparro, J. M., Badri, D. V., Bakker, M. G., Sugiyama, A., Manter, D. K., and Vivanco, J. M. 2013. Root exudation of phytochemicals in *Arabidopsis* follows specific patterns that are developmentally programmed and correlate with soil microbial functions. *PLoS One.* 8:1–10
- Chen, L., Heng, J., Qin, S., and Bian, K. 2018. A comprehensive understanding of the biocontrol potential of *Bacillus velezensis* LM2303 against *Fusarium* head blight. *PLoS One.* 13:1–22
- Crane, J. M., Gibson, D. M., Vaughan, R. H., and Bergstrom, G. C. 2012. Iturin levels on wheat spikes linked to biological control of *Fusarium* head blight by *Bacillus amyloliquefaciens*. *Phytopathology.* 103:146–155
- Dartois, V., Djavakhishvili, T., and Hoch, J. A. 1996. Identification of a membrane protein involved in activation of the KinB pathway to sporulation in *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.* 178:1178–86
- Driks, A. 1999. *Bacillus subtilis* Spore coat. *Society.* 63:1–20
- Eswaramoorthy, P., Duan, D., Dinh, J., Dravis, A., Devi, S. N., and Fujita, M. 2010. The threshold level of the sensor histidine kinase KinA governs entry into sporulation in *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.* 192:3870–3882
- Haney, C. H., Samuel, B. S., Bush, J., and Ausubel, F. M. 2015. Associations with rhizosphere bacteria can confer an adaptive advantage to plants. *Nat. Plants.* 1:15051
1. Hartmann, A., Rothballer, M., and Schmid, M. 2008. Lorenz Hiltner, a pioneer in rhizosphere microbial ecology and soil bacteriology research. *Plant Soil.* 312:7–14
- Higgins, D., and Dworkin, J. 2013. Recent progress in *Bacillus subtilis* sporulation. *FEMS Microbiol. Rev.* 36:131–148
- Igarashi, T., and Setlow, P. 2006. Transcription of the *Bacillus subtilis* gerK operon, which encodes a spore germinant receptor, and comparison with that of operons encoding other germinant receptors. *J. Bacteriol.* 188:4131–4136

Kolodkin-Gal, I., Elsholz, A. K. W., Muth, C., Girguis, P. R., Kolter, R., and Losick, R. 2013. Respiration control of multicellularity in *Bacillus subtilis* by a complex of the cytochrome chain with a membrane-embedded histidine kinase. *Genes Dev.* 27:887–899

Lareen, A., Burton, F., and Schäfer, P. 2016. Plant root-microbe communication in shaping root microbiomes. *Plant Mol. Biol.* 90:575–587

Li, L., Kim, P., Yu, L., Cai, G., Chen, S., Alfano, J. R., and Zhou, J. M. 2016. Activation-dependent destruction of a co-receptor by a *Pseudomonas syringae* effector dampens plant immunity. *Cell Host Microbe.* 20:504–514

Liu, W., He, Z., Gao, F., Yan, J., and Huang, X. 2018. Sensor kinase KinB and its pathway-associated key factors sense the signal of nutrition starvation in sporulation of *Bacillus subtilis*. *Microbiologyopen.* 7:e00566

Lugtenberg, B., and Kamilova, F. 2009. Plant-Growth-Promoting Rhizobacteria. *Annu. Rev. Microbiol.* 63:541–556

Matilla, M. A., Ramos, J. L., Bakker, P. A. H. M., Doornbos, R., Badri, D. V., Vivanco, J. M., and Ramos-González, M. I. 2009. *Pseudomonas putida* KT2440 causes induced systemic resistance and changes in *Arabidopsis* root exudation. *Environ. Microbiol. Rep.* 2:381–388

McLoon, A. L., Kolodkin-Gal, I., Rubinstein, S. M., Kolter, R., and Losick, R. 2011. Spatial regulation of histidine kinases governing biofilm formation in *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.* 193:679–685

Meeske, A. J., Rodrigues, C. D. A., Brady, J., Lim, H. C., Bernhardt, T. G., and Rudner, D. Z. 2016. High-throughput genetic screens identify a large and diverse collection of new sporulation genes in *Bacillus subtilis*. *PLoS Biol.* 14:1–33

Mendis, H. C., Thomas, V. P., Schwientek, P., Salamzade, R., Chien, J. T., Waidyarathne, P., Kloepper, J., and De La Fuente, L. 2018. Strain-specific quantification of root colonization by plant growth promoting rhizobacteria *Bacillus firmus* I-1582 and *Bacillus amyloliquefaciens* QST713 in non-sterile soil and field conditions. *PLoS One.* 13:e0193119

Mielich-süss, B., and Lopez, D. 2015. Minireview Molecular mechanisms involved in *Bacillus subtilis* biofilm formation. *Environ. Microbiol.* 17:555–565

Mönchgesang, S., Strehmel, N., Schmidt, S., Westphal, L., Taruttis, F., Müller, E., Herklotz, S., Neumann, S., and Scheel, D. 2016. Natural variation of root exudates in *Arabidopsis thaliana*-linking metabolomic and genomic data. *Sci. Rep.* 6:29033

Nicholson, W. L., and Setlow, P. 1990. Sporulation, germination and outgrowth. Pages 391–431 in: *Molecular Biological Methods for Bacillus*, John Wiley and Sons Ltd.

Niu, D., Liu, H., Jiang, C., Wang, Y., Wang, Q., Jin, H., and Guo, J. 2011. The Plant Growth – Promoting Rhizobacterium *Bacillus cereus* AR156 induces systemic resistance in *Arabidopsis thaliana* by simultaneously activating salicylate- and jasmonate/Ethylene-dependent signaling pathways. *Mol. Plant. Microbe. Interact.* 24:533–542

Ongena, M., and Jacques, P. 2008. *Bacillus* lipopeptides: versatile weapons for plant disease biocontrol. *Trends Microbiol.* 16:115–125

Ramírez-Guadiana, F. H., Meeske, A. J., Wang, X., Rodrigues, C. D. A., and Rudner, D. Z. 2017. The *Bacillus subtilis* germinant receptor GerA triggers premature germination in response to morphological defects during sporulation. *Mol. Microbiol.* 105:689–704

Rudrappa, T., Czymmek, K. J., Pare, P. W., and Bais, H. P. 2008. Root-Secreted malic acid recruits beneficial soil bacteria. *Plant Physiol.* 148:1547–1556

Setlow, P. 2014. Germination of spores of *Bacillus* species: What we know and do not know. *J. Bacteriol.* 196:1297–1305

Shah, I. M., Laaberki, M. H., Popham, D. L., and Dworkin, J. 2008. A eukaryotic-like Ser/Thr kinase signals bacteria to exit dormancy in response to peptidoglycan fragments. *Cell.* 135:486–496

Sivasakthi, S., Usharani, G., and Saranraj, P. 2014. Biocontrol potentiality of plant growth promoting bacteria (PGPR) - *Pseudomonas fluorescens* and *Bacillus subtilis* : A review. *African J. Agric. Res.* 9:1265–1277

Tojo, S., Hirooka, K., and Fujita, Y. 2013. Expression of *kinA* and *kinB* of *Bacillus subtilis*, necessary for sporulation initiation, is under positive stringent transcription control. *J. Bacteriol.* 195:1656–1665

Vacheron, J., Desbrosses, G., Bouffaud, M.-L., Touraine, B., Moënne-Loccoz, Y., Muller, D., Legendre, L., Wisniewski-Dyé, F., and Prigent-Combaret, C. 2013. Plant growth-promoting rhizobacteria and root system functioning. *Front. Plant Sci.* 4:1–19

Vejan, P., Abdullah, R., Khadiran, T., Ismail, S., and Nasrulhaq Boyce, A. 2016. Role of plant growth promoting rhizobacteria in agricultural sustainability-A review. *Molecules.* 21:1–17



Xie, S., Jiang, H., Ding, T., Xu, Q., Chai, W., and Cheng, B. 2017. *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42 repressed plant miR846 to induce systemic resistance via jasmonic acid-dependent signaling pathway. *Mol. Plant Pathol.* 19:1612–1623

Yang, D. H., Hettenhausen, C., Baldwin, I. T., and Wu, J. 2011. The multifaceted function of BAK1/SERK3: Plant immunity to pathogens and responses to insect herbivores. *Plant Signal. Behav.* 6:1322–1324

Yasbin, R. E., and Young, F. E. 1974. Transduction in *Bacillus subtilis* by Bacteriophage SPP1. *J. Virol.* 14:1343–1348

Yasuda, S., Okada, K., and Saijo, Y. 2017. A look at plant immunity through the window of the multitasking coreceptor BAK1. *Curr. Opin. Plant Biol.* 38:10–18

Zerouh, H., de Vicente, A., Pérez-García, A., and Romero, D. 2014. Surfactin triggers biofilm formation of *Bacillus subtilis* in melon phylloplane and contributes to the biocontrol activity. *Environ. Microbiol.* 16:2196–2211

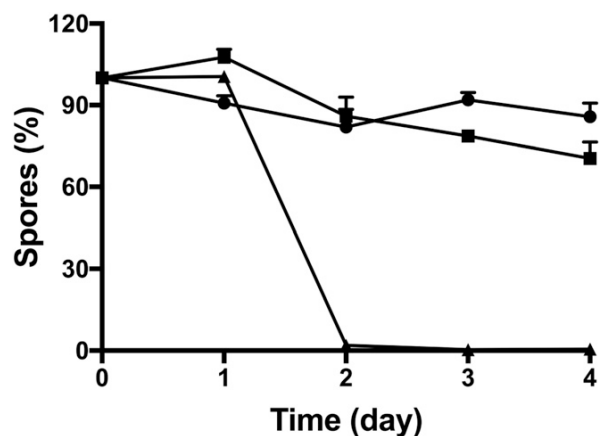
#### 2.2.8 Supplementary data

**Table S2.1. All strains used in this study.**

Strains	Genotype	Reference/source
NCIB3610	Wild-type/Undomesticated strain	Beauregard Lab stock
PB22	<i>sigF::km</i>	CA002 <sup>7</sup>
PB32	<i>kinA::erm</i>	FC63 <sup>2</sup>
PB217	<i>kinB::cat</i>	HV1326 <sup>3</sup>
PB218	<i>kinC::cat</i>	HV1260 <sup>4</sup>
PB219	<i>kinD::tet</i>	DL153 <sup>5</sup>
PB201	<i>kinE::erm</i>	HV1205 <sup>6</sup>
VCL54	<i>gerAB::erm</i>	BKE33060 <sup>1</sup> in NCIB3610

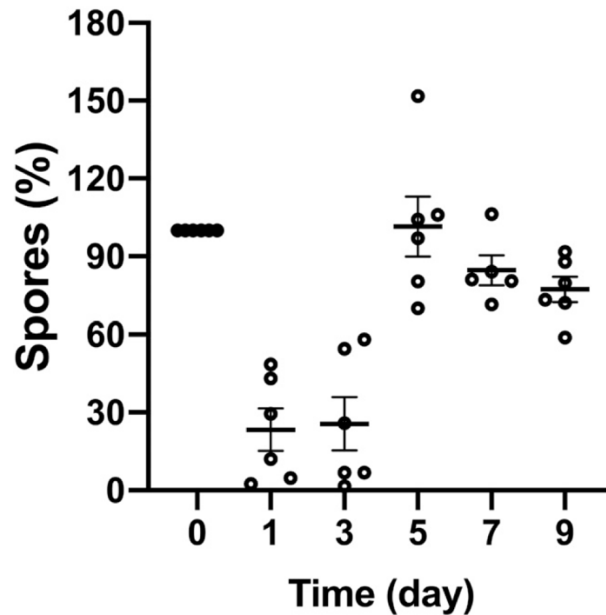
VCL46	<i>gerBB::erm</i>	BKE35810 <sup>1</sup> in NCIB3610
VCL48	<i>gerKB::erm</i>	BKE03720 <sup>1</sup> in NCIB3610
VCL50	<i>yfkQ::erm</i>	BKE07790 <sup>1</sup> in NCIB3610
VCL52	<i>prkC::erm</i>	BKE15770 <sup>1</sup> in NCIB3610
MT574	<i>yndF::erm</i>	BKE17770 <sup>1</sup> in NCIB3610
* <i>Pseudomonas fluorescens</i> WCS365	Wild-type	Beauregard Lab stock

\*Unless indicated, all strains are derivatives of *B. subtilis* NCIB3610. Antibiotics: chloramphenicol (cat), erythromycin/lincomycin (erm), tetracycline (tet), kanamycin (km).



**Figure S2.1. The medium Murashige and Skoog had no impact on the sporulation level of *Bacillus subtilis*.**

Spores of *B. subtilis* WT were inoculated in 1/2 MS supplemented with sucrose and AGFK (positive control). The circle represents 1/2 Murashige and Skoog, the square represents 1/2 Murashige and Skoog supplemented with 2% sucrose, and the triangle represents the positive control (AGFK). The percentage of spore was evaluated each day for 4 days post inoculation.



**Figure S2.2. *B. subtilis* sporulation dynamic on seedlings in soil.**

*A. thaliana* seeds coated by spores were inoculated on soil and incubated in the growth chamber. Seedlings were harvested and sonicated to assess the % of spore on total CFU at different days (1, 3, 5, 7, 9). Results shown are representative of at least 3 independent experiments and error bars represent the SEM (seedlings harvested per time points n=6).



**Figure S2.3. Inoculation of *B. subtilis* vegetative cells induces *A. thaliana* browning roots.**

Three days-old plants were rhizo-inoculated with wild-type *B. subtilis* cells (in vegetative state). After 7 days of incubation, plants were visualized using a stereomicroscope Leika M165 FC (Leika). Results shown are representative of at least 3 independent experiments (non-inoculated plants n=19; inoculated plants n=28).

#### 2.2.8.1 References

1. Koo, B., Kritikos, G., Farelli, J. D., Todor, H., Tong, K., Kimsey, H., Wapinski, I., Galardini, M., Cabal, A., Peters, J. M., Hachmann, B., Rudner, D. Z., Allen, K. N., Typas, A., and Carol, A. 2017. Libraries for *Bacillus subtilis*. *Cell Syst.* 4:291–305.e7.
2. McLoon, A. L., Guttenplan, S. B., Kearns, D. B., Kolter, R., and Losick, R. 2011. Tracing the domestication of a biofilm-forming bacterium. *J. Bacteriol.* 193:2027–2034
3. Beauregard, P. B., Chai, Y., Vlamakis, H., Losick, R., and Kolter, R. 2013. *Bacillus subtilis* biofilm induction by plant polysaccharides. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 110:E1621–E1630

4. Aguilar, C., Vlamakis, H., Guzman, A., Losick, R., and Kolter, R. 2010. KinD is a checkpoint protein linking spore formation to extracellular-matrix production in *Bacillus subtilis* biofilms. *MBio*. 1:e00035-10
5. López, D., Vlamakis, H., Losick, R., and Kolter, R. 2009. Paracrine signaling in a bacterium. *Genes Dev*. 23:1631–1638
6. Shank, E. A., Klepac-Ceraj, V., Collado-Torres, L., Powers, G. E., Losick, R., and Kolter, R. 2011. Interspecies interactions that result in *Bacillus subtilis* forming biofilms are mediated mainly by members of its own genus. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 108:E1236–E1243
7. Vlamakis, H., Aguilar, C., Losick, R., and Kolter, R. 2008. Control of cell fate by the formation of an architecturally complex bacterial community. *Genes Dev*. 22:945–953

# CHAPITRE 3

## ***BACILLUS SUBTILIS* AND *BACILLUS VELEZENSIS* POPULATION DYNAMICS AND QUANTIFICATION OF SPORES AFTER INOCULATION ON ORNAMENTAL PLANTS**

### **3.1 Introduction**

#### 3.1.1 Pertinence

Les conditions établies dans les études réalisées en laboratoire ne reflètent pas toujours celles retrouvées en milieu naturel et remettent parfois en question la pertinence des résultats et conclusions déterminés en laboratoire. Or, dans les interactions plantes – microbes, l'utilisation de serres permet de se rapprocher davantage des conditions représentatives de l'environnement.

La compagnie horticole *Plant Select* située à Saint-Paul-d'Abbotsford, utilise le produit Serenade SOIL® de Bayer (*B. velezensis*) afin de diminuer l'usage des pesticides chimiques pour leur culture. Ils nous ont contactés afin de développer une collaboration pour déterminer les causes possibles expliquant les résultats variables qu'ils obtiennent d'une année à l'autre. Cette collaboration était une opportunité de transposer nos connaissances obtenues en laboratoire sur la formation des spores sur des plantes cultivées en serre.

Il est important de noter que le système d'arrosage utilisé par la compagnie est aérien et imite ainsi les conditions de précipitation naturelle. Également, ils utilisent un pulvérisateur pour asperger le produit Serenade SOIL® sous forme de spores au

niveau des parties aériennes des plantes et l'application abondante du produit atteint le sol par écoulement.

Nous avons élaboré un système expérimental qui consistait à utiliser trois espèces de plante (*Echinacea purpurea* 'Salsa red', *Echinacea purpurea* 'Fatal attraction' et *Lavandula angustifolia* 'Hidecote blue') pour quantifier les spores dans la population de deux espèces bactériennes (*B. velezensis* QST 713 et *B. subtilis* NCIB 3610) au niveau de trois sites différents : feuilles, racines et sol. Nous avons pu démontrer que dans les conditions expérimentales de la serre, les spores germaient rapidement au niveau des racines et la population reste relativement stable sur une période de 21 jours. Au niveau des feuilles, la population bactérienne diminue drastiquement suggérant un lessivage par le système d'arrosage. Au niveau du sol, les spores ne semblent pas se différencier et restent dormantes. Ensemble, cette étude a mené à des recommandations précises, c.-à-d., favoriser une inoculation au niveau racinaire plutôt que foliaire et un ensemencement répété pour favoriser une population active. Ces suggestions permettront d'optimiser les chances de succès du produit à base de bactéries bénéfiques.

### 3.1.2 Apport des auteurs

Le projet a émergé à la suite d'une discussion entre Pascale B. Beauregard et le directeur de la compagnie *Plant Select*, Alain Baril. J'ai alors dirigé et conceptualisé la suite du projet avec Maude Thérien et Pascale B. Beauregard et ai participé à l'élaboration du système expérimental.

Assena Konk avait la charge d'aller récupérer les plantes directement des serres et a réalisé une grande partie des expériences. J'ai conçu les figures, réalisé les statistiques et ai rédigé la première version de l'article. Pascale B. Beauregard a modifié en profondeur le manuscrit avant que ce dernier soit relu et critiqué par Alain Lavigueur.

### 3.1.3 Référence

**Charron-Lamoureux V\***, Thérien M\*, Konk A, Beauregard PB. (2020) *Bacillus subtilis* and *Bacillus velezensis* population dynamics and quantification of spores after inoculation on ornamental plants. *Canadian Journal of Microbiology*. 66 (11), 664-669.

\*co-1<sup>er</sup> auteur

Mots clés : *Bacillus*, plantes, colonisation, population, spores



## 3.2 Article

### 3.2.1 Page titre

#### ***Bacillus subtilis* and *Bacillus velezensis* population dynamics and quantification of spores after inoculation on ornamental plants**

### 3.2.2 Abstract

*Bacillus subtilis* and *Bacillus velezensis* are used in organic agriculture as an alternative to chemical pesticides to fight against phytopathogen organisms. These Gram-positive soil-dwelling bacteria are able to resist harsh conditions and survive by differentiating into endospores. Few studies have examined how bacterial populations change on plants over time, and whether they remain active or enter a dormant state. Nonetheless, these characteristics are strikingly important to determine the usage of *B. subtilis* and *B. velezensis* and their efficacy in environmental conditions. Here, we investigated the population dynamics of *B. subtilis* NCIB3610 and *B. velezensis* QST713 when applied as spores on different ornamental plants. We report that on all the plants studied (*Echinacea purpurea* 'Salsa red', *Echinacea purpurea* 'Fatal attraction', and *Lavandula angustifolia* 'Hidecote blue'), spores rapidly germinated and colonized the rhizoplane, maintaining a relatively low proportion of spores in the population over time, whereas the bacterial population on the leaves rapidly declined. Bacteria in the surrounding soil did not germinate and persisted as spores. Taken together, these results suggest that only cells found at the rhizosphere remain metabolically active to allow the formation of a lasting relationship with the plant, making possible beneficial effects from the inoculated bacteria.

### 3.2.3 Résumé

*Bacillus subtilis* et *Bacillus velezensis* sont utilisées en agriculture biologique comme alternative aux pesticides chimiques. Ces bactéries Gram-positives vivant dans le sol sont capables de résister à des conditions difficiles et de survivre en se différenciant en endospores. Peu d'études ont examiné comment les bactéries persistent sur les plantes, si elles demeurent actives ou entrent en dormance. Néanmoins, ces caractéristiques sont importantes pour déterminer leur utilisation et leur efficacité dans des conditions environnementales. Nous avons étudié la dynamique de population de *B. subtilis* NCIB3610 et de *B. velezensis* QST713 lorsqu'appliquées comme spores sur différentes plantes ornementales. Nous montrons que sur toutes les plantes étudiées (*Echinacea purpurea* cv. Salsa red, *Echinacea purpurea* cv. Fatal attraction et *Lavandula angustifolia* cv. Hidecote blue) les spores ont rapidement germées et colonisées la rhizoplane, maintenant une proportion relativement faible de spores dans la population, alors que la population sur les feuilles a rapidement diminué. Les bactéries présentes dans le sol environnant n'ont pas germé et ont persisté sous forme de spores. Ces résultats suggèrent que seules les bactéries trouvées au niveau des racines restent métaboliquement actives pour permettre la formation d'une relation durable avec la plante, rendant possible les effets bénéfiques des bactéries

### 3.2.4 Introduction

The agricultural usage of fertilizers and chemical pesticides has an important impact on both human health and ecosystem balance (Aktar et al. 2009; Nicolopoulou-Stamati et al. 2016; Carvalho 2017). Thus, there is a need to find alternative solutions with similar efficacy and reliability to help reduce the heavy use of chemical products. Plant-growth promoting rhizobacteria (PGPR) provide positive effects on plants through indirect or direct pathways (Rudrappa et al. 2008; Berg 2009; Chen et al. 2013;

Chowdhury et al. 2015). These bacteria, such as members of *Azotobacter*, *Pseudomonas*, *Bacillus* and *Klebsiella* genera, can fix nitrogen, secrete growth-stimulating phytohormones and, importantly, provide resistance against a wide range of pathogens (Arkhipova et al. 2005; Ahemad and Kibret 2014).

The rhizosphere is composed of the zone directly influenced by plant roots, its exudates and mucilage, and constitutes a nutrient-rich environment hosting a complex community of microorganisms (Garbeva et al. 2004; Hartmann et al. 2008) which contrast with the surrounding soil further from the plant. Depending on the plant species, its age and the environmental conditions, root exudates composition is very dynamic and can influence the rhizosphere microbiome (Zhalnina et al. 2018). Inversely, the above-ground parts of plants are known to be a more hostile environment for microorganisms. Leaves surface, known as the phyllosphere, is particularly poor in nutrients and faces environmental stresses such as UV radiations, drastic temperature changes and variable access to moisture caused by wind and precipitations (Yang et al. 2001; Lindow and Brandl 2003; Turner 2013).

*Bacillus subtilis* and *Bacillus velezensis* are Gram-positive PGPR that can form endospores, allowing bacteria to survive for long periods in stressful environments (Fan et al. 2018; Hashem et al. 2019). Their capacity to withstand inhospitable environments, and thus persist over time, makes *Bacillus* spores ideal for the formulation of biofertilizers and biofungicides. However, sporulation could also limit the duration of the bacterial beneficial activities provided to plants, since most of these activities, such as antimicrobial secretion, require an active metabolism. Currently, there is a lack of knowledge on colonization efficiency and, more importantly, on the sporulation of *Bacillus* spp. on plants in industrial growing conditions. In collaboration with a greenhouse grower, we examined the efficacy of two *Bacillus* species to colonize and to differentiate from spores into metabolically active bacteria on plants. Three ornamental plant cultivars, *Echinacea purpurea* (Purple coneflower) cv. Salsa red, *Echinacea purpurea* cv. Fatal attraction and *Lavandula angustifolia* (English lavender)

cv. Hidecote blue, were chosen as models because of their market value and sensitivity to fungal pathogens. Those will thereafter be referred to as *E. purpurea* SR or FA and *L. angustifolia*.

### 3.2.5 Methods

For this study, we used *Bacillus subtilis* NCIB3610 (undomesticated strain) harboring a spectinomycin resistance cassette (Lécuyer et al. 2018) and *Bacillus velezensis* QST713 (Serenade SOIL®, Bayer), already used in Canada as a biofungicide. Bacteria were routinely grown in Luria-Bertani (LB) medium in Petri dishes (1% tryptone, 0.5% yeast extract and 0.5% NaCl) at 37 °C, and incubated in 100 mL of Difco Sporulation Medium (DSM) during 20 h at 37 °C with agitation to induce sporulation (Nicholson and Setlow 1990). Treatment at 80 °C for 20 min was used to kill vegetative cells before the spores are resuspended in sterile distilled water for inoculation. Inoculation was performed on mature plants intended for sale in garden centers. Of note, we did not observe presence of *B. subtilis* or *B. velezensis* on leaves, roots, or soil of non-inoculated *E. purpurea* FA. This result was obtained by evaluating CFU counts on a selective differential medium for *Bacillus* species (PEMBA), as described further in the text. Since all plants were in the same non-sterile soil and maintained in the same conditions, we concluded that there was no or only very few indigenous *Bacillus* on plants before we inoculated them. For inoculation, 25 mL of a *B. subtilis* spores solution at an OD<sub>600</sub> = 0.75 (~1,5x10<sup>7</sup> CFU/mL) were resuspended in deionized water and applied by spraying onto each plant. For *B. velezensis* QST713, 10 to 30 mL (~1.5x10<sup>7</sup> CFU/mL) from the Serenade SOIL® (Bayer) were also vaporized on plants with a pump sprayer according to the usual procedures of the Plant Select company (Saint-Paul d'Abbotsford, Québec, Canada). Inoculants are applied by spraying mostly on aerial parts for timesaving. We collected samples from the phyllosphere (entire leaves), from the rhizosphere (roots parts with the soil attached) and from soil, further from the roots and their influence (from the periphery of the pot). Each sample was weighed and

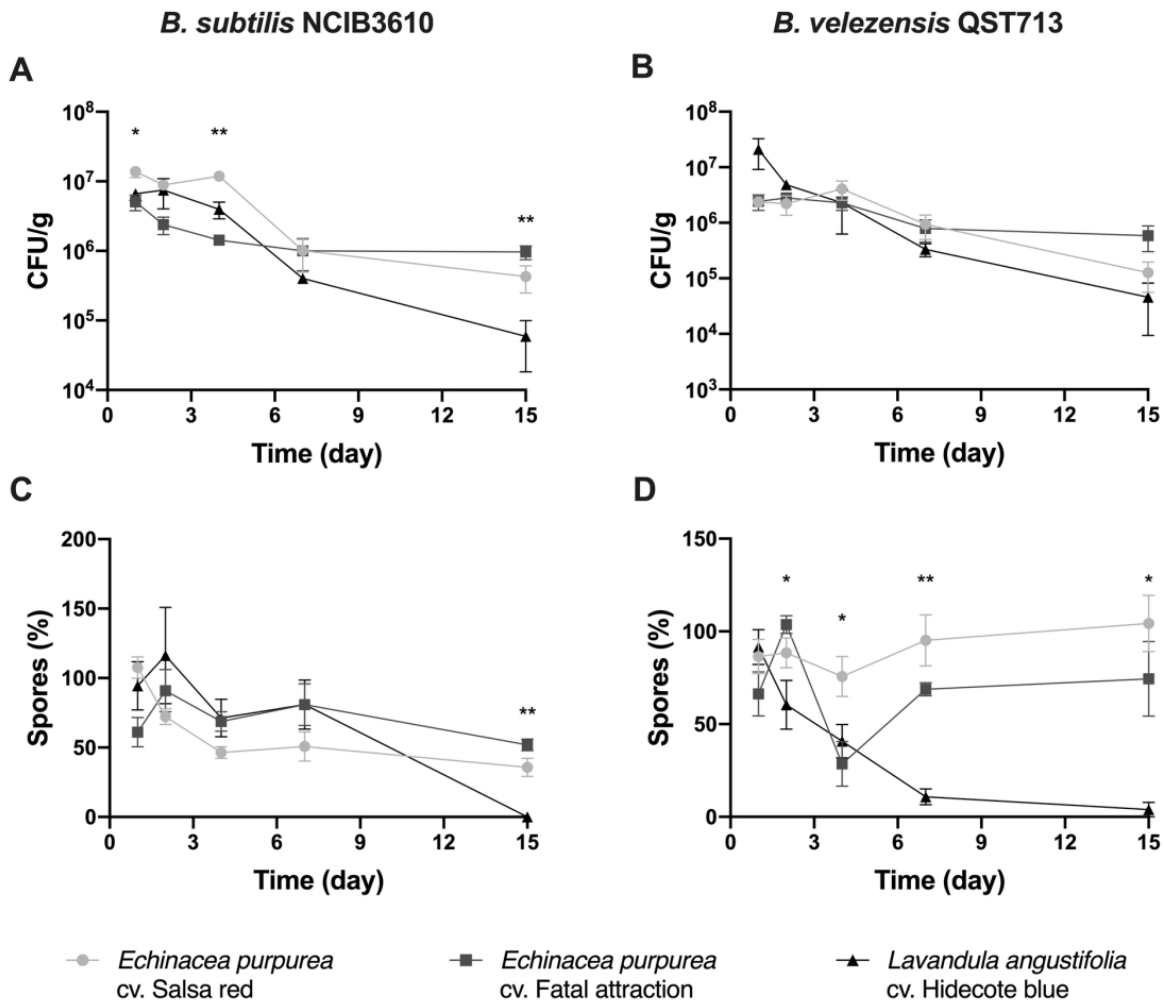
suspended in 5 mL of phosphate-buffered saline (PBS) for sonication treatment at 1 s start and 1 s pause for 10 s at 30% amplitude, 3 times, to remove attached bacteria and break the aggregates. To evaluate cell counts, samples were diluted and plated on selective media: LB supplemented with spectinomycin (100 µg/mL) with cycloheximide at 5 mg/L for *B. subtilis* NCIB3610 (SpecR) and PEMBA (0.1% peptone, 1% mannitol, 0.2% NaCl, 0.01% MgSO<sub>4</sub>, 0.25% Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0.025% KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 1% sodium pyruvate, 0.012% bromothymol blue, 1.5% agar and 2.5% egg Yolk emulsion) with polymyxin B at 12.7 mg/L (prevents the growth of Gram-negative bacteria) supplemented with cycloheximide at 5 mg/L (inhibits growth of eukaryotes) for *B. velezensis* QST713. On this medium, QST713 forms medium-sized, flat, nearly-round with undulate margins, opaque, cream-colored, dull colonies and does not ferment mannitol nor precipitate egg yolk, allowing for a fairly precise identification. A similar phenotypical analysis was used to differentiate NCIB3610 colonies on LB spectinomycin. To evaluate the proportion of spores, the same samples were then heat-treated at 80 °C for 20 min to kill vegetative cells before inoculation on plates. We evaluated the proportion of spores in the population by dividing the number of spores by the total number of cells. Of note, few bacterial aggregates might persist through the sonication process, leading to an underestimation of the total cell count, while heat treatment allows their dissociation.

### 3.2.6 Results and discussion

Following the application of spores on above-ground parts of plants, we evaluated the population dynamics by CFU counts. At day 1, *B. subtilis* and *B. velezensis* were found on all studied sites (leaves, soil and roots) of the three plants (Figure 3.1-3.3.). CFU counts at day 1 were generally higher on leaves, in concordance with the aerial spraying application method. However, the bacterial population on leaves never increased over time, and this for all plants, suggesting that there was no sustainable colonization on this plant site (Figures 3.1A and 3.1B). On *E. purpurea* SR and *L. angustifolia* leaves, we observed a 2-fold log reduction for both *B. subtilis* and *B.*

*velezensis* during the 15 days, while on leaves of *E. purpurea* FA populations had a smaller decrease. Bacteria in the population on leaves were mostly spores for both strains on *Echinacea* cultivars through the experiment, while on *L. angustifolia*, bacterial cells appeared to be mostly vegetative by the end of the assay (Figures 3.1C and 3.1D). The decrease in total population and the large proportion spores on leaves could be explained by two phenomena. Bacteria in the phyllosphere are submitted to numerous stress factors such as nutrients depletion and fluctuation of environmental conditions (Lindow and Brandl 2003) which would explain the high number of spores on *Echinacea* cultivars and the rapid decline of the population on leaves, including on *L. angustifolia* where cells have germinated. Also, greenhouses use an aerial water-spray system which likely washes off bacteria not firmly associated with the leaf surface. Our observations that spores are predominant on plant leaves are in concordance with previous results indicating that spores represent approximately 60% of *Bacillus subtilis* UMAF6614 population after 7 days when inoculated on melon leaves (Zerrouh et al. 2014).

LEAVES



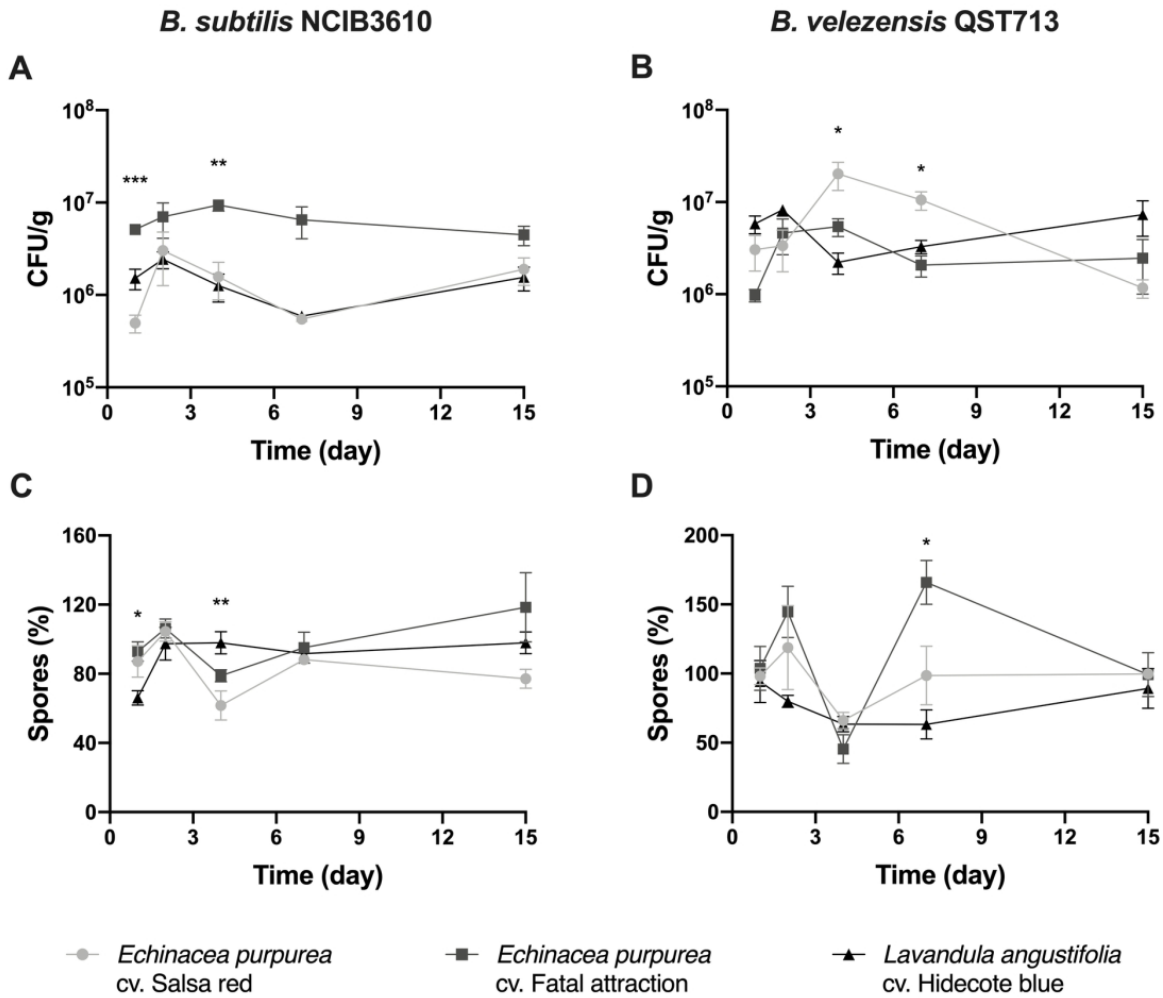
**Figure 3.1. Dynamics of population (CFU/g) and proportion of spores (%) of *B. subtilis* and *B. velezensis* on *E. purpurea* SR (gray circle), FA (dark-gray square) and *L. angustifolia* (black triangle) on leaves.**

A) Total cells of *B. subtilis* on leaves. Statistical analysis showed a significant difference between *E. purpurea* SR and the two other cultivars at day 1 and 4, and between *L. angustifolia* and the other cultivars at day 15. B) Total cells of *B. velezensis* on leaves. C) Proportion of spores in *B. subtilis* population on leaves. At day 15, statistical analysis demonstrated a difference between *L. angustifolia* compared to the other plant species.

D) Proportion of spores in *B. velezensis* population on leaves. Statistical analysis revealed significant differences between *E. purpurea* FA and *L. angustifolia* at day 2, between *E. purpurea* SR and *E. purpurea* FA at day 4, between *L. angustifolia* and the two other plants at day 7, and between *L. angustifolia* and the two *Echinacea* plants at day 15. For all panels, two biological replicates composed of 4 technical replicates were combined. Error bars represent the standard error of the mean. Statistical significance was assayed using One-way ANOVA, followed by Tukey's test (\* =  $P < 0.05$ , \*\* =  $P < 0.01$ ).



SOIL



**Figure 3.2. Dynamics of population (CFU/g) and proportion of spores (%) of *B. subtilis* and *B. velezensis* on *E. purpurea* SR (gray circle), cv. FA (dark-gray square) and *L. angustifolia* (black triangle) in soil.**

A) Total cells of *B. subtilis* in the soil. Statistical analysis showed significant differences between *E. purpurea* FA and the two other cultivars at day 1 and 4. B) Total cells of *B. velezensis* in the soil. At day 4, there was a statistical difference between *E. purpurea* SR and *L. angustifolia* as well as between *E. purpurea* SR compared to the other plant species at day 7. C) Proportion of spores in *B. subtilis* population in soil. Significant

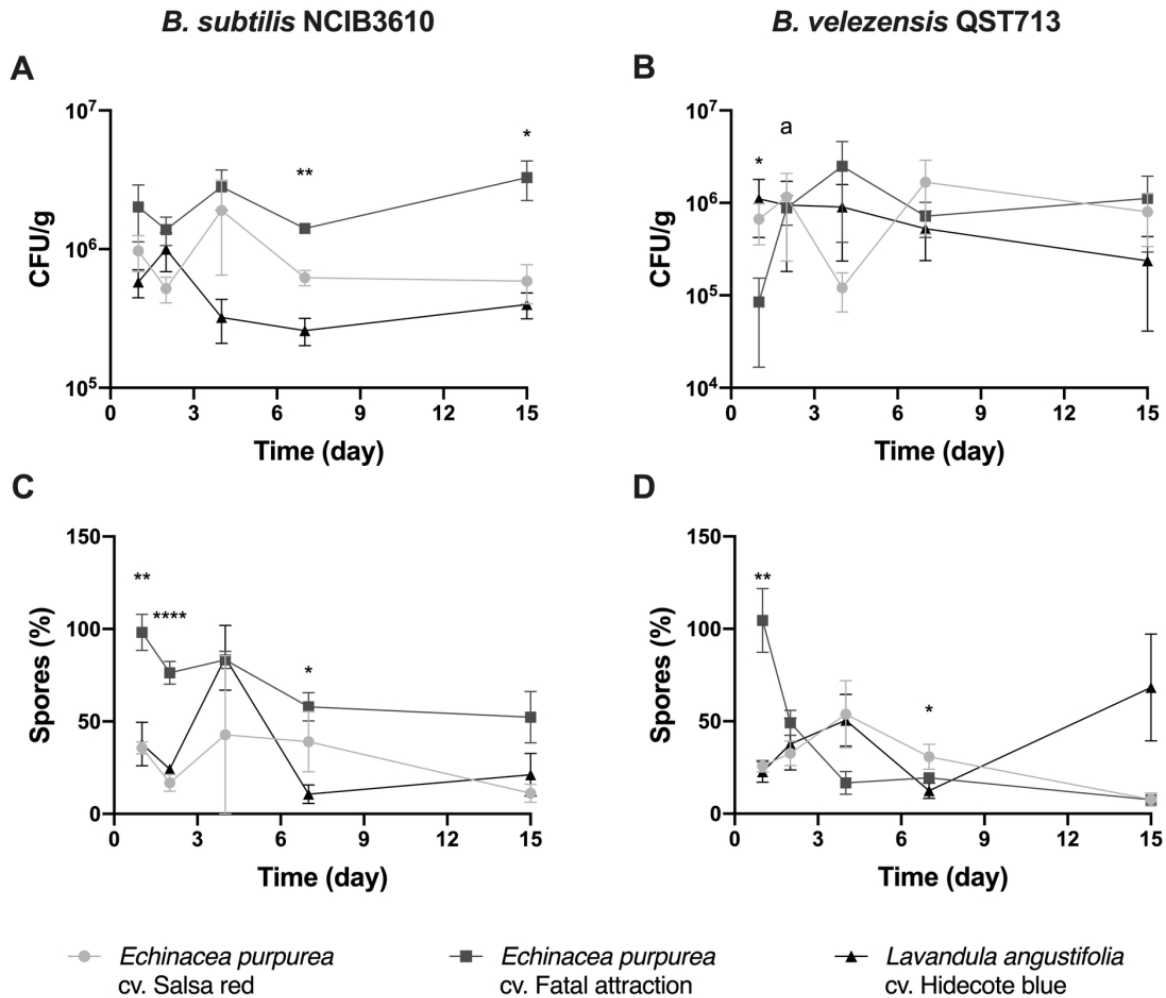
differences were observed between *E. purpurea* FA and *L. angustifolia* at day 1 and between *L. angustifolia* and *E. purpurea* SR at day 4. D) Proportion of spores in *B. velezensis* population in the soil. Statistical analysis revealed a significant difference between *E. purpurea* FA and *L. angustifolia* at day 7. For all panels, two biological replicates composed of 4 technical replicates were combined. Error bars represent the standard error of the mean. Statistical significance was assayed using One-way ANOVA, followed by Tukey's test (\* =  $P < 0.05$ , \*\* =  $P < 0.01$ , \*\*\* =  $P < 0.001$ , \*\*\*\* =  $P < 0.0001$ ).

We also examined the presence of *Bacillus* in the soil not under the direct influence of the plant. *B. subtilis* is a soil-dwelling bacteria, but this environment contains certain constraints, especially predators, nutrients limitation and moisture availability, which do not favor its development and possess very little of the free nutrients required for its germination (Hinsinger et al. 2009; Moe 2013; Fierer 2017). Accordingly, population of both *Bacillus* species in soil remained high and stable over time but also appeared to be mostly composed of spores (Figure 3.2.).

Finally, we examined colonization as well as the variation in the presence of spores in the rhizosphere. For *E. purpurea* SR and *L. angustifolia*, population of both *Bacillus* species on roots remained somewhat stable through time. However, this was not the case with *E. purpurea* FA since *B. subtilis* population remained stable from day 1 to 15 but *B. velezensis* CFU count increased by 1-fold log on the root surface during the first four days (Figure 3A and B) showing an efficient colonization. These results suggest that *B. velezensis* QST713 might be more adapted than *B. subtilis* NCIB3610 for the colonization of the rhizosphere, in the case of the studied plants. This hypothesis was further supported by the evaluation of the proportion of spores in the *Bacillus* population associated with roots. For all combinations tested, except for *B. subtilis* on *E. purpurea* FA, germination on roots was efficient since there were less than 50% of spores at most time points (Figures 3.3C and D). Particularly, *B. velezensis* spores level remained very

low throughout the experiment, vegetative cells sometimes reaching up to 93% of the bacterial population (Figure 3.3D), which demonstrates that this population is metabolically active. The difference between the metabolic state of both strains could stem from diverse reasons, such as a better efficacy of *B. velezensis* to use nutrients sources in the root exudates or presence of germination receptors more specific to molecules secreted in the rhizosphere by these ornamental plants. Such discrepancy between bacterial strains was observed in other studies. *B. velezensis* QST713 and *B. firmus* I-1582 have different colonization efficiency when applied on corn seeds, since cell counts gradually decreased from  $10^7$  to  $10^5$  CFU/g of root for QST713 and from  $10^6$  to  $10^4$  CFU/g of root for I-1582 (Mendis et al. 2018). Of note, molecules excreted in root exudates vary between plant species, which suggests that a bacteria well adapted to the rhizosphere of one plant could be less adapted to another plant (Turner 2013).

ROOTS



**Figure 3.3. Dynamics of population (CFU/g) and proportion of spores (%) of *B. subtilis* and *B. velezensis* on *E. purpurea* SR (gray circle), FA (dark-gray square) and *L. angustifolia* (black triangle) on roots.**

A) Total cells of *B. subtilis* on roots. Statistical analysis showed significant differences between all plants at day 7, and between *E. purpurea* FA, and the two other species at day 15. B) Total cells of *B. velezensis* on roots. At day 1, a statistical analysis demonstrated the difference between *E. purpurea* FA and *L. angustifolia*. Statistical analysis was evaluated using a t test. Letter “a” denotes a significant increase in total cells between day

1 and 2. C) Proportion of spores in *B. subtilis* population on roots. Significant differences were observed between *E. purpurea* FA and the other plants at day 1 and 2, and between *E. purpurea* FA and *L. angustifolia* at day 7. D) Proportion of spores in *B. velezensis* population on roots. Statistical analysis revealed significant differences between *E. purpurea* FA and all other plants at day 1 and at day 7, between *E. purpurea* SR and *L. angustifolia*. For all panels, two biological replicates composed of 4 technical replicates were combined. Error bars represent the standard error of the mean. Statistical significance was assayed using One-way ANOVA, followed by Tukey's test (\* =  $P < 0.05$ , \*\* =  $P < 0.01$ , \*\*\*\* =  $P < 0.0001$ ).

This predominance of *B. subtilis* vegetative cells on roots of greenhouse ornamental plants contrasts with our recent observation that *B. subtilis* total number of spores rapidly increases following inoculation and germination of sporulated bacteria on *A. thaliana* roots (Charron-Lamoureux and Beauregard 2019). However, seedlings were used for the *A. thaliana* experiment, while mature plants in greenhouses were used here. The sharp difference in the amount and composition of nutrients secreted in both experimental set-ups could explain the difference in the proportions of spores. Furthermore, the *A. thaliana* study was performed in sterile hydroponic conditions, while here we used non-sterile soil, which could also contribute to the difference in metabolic activity of the bacteria. Indeed, it might be of interest to evaluate if other microorganisms from the rhizosphere can favor the vegetative state of *Bacillus* species over sporulation.

Taken together, our results show that, following application on plants, spores of both *B. subtilis* NCIB3610 and *B. velezensis* QST713 are rapidly differentiating into metabolically active cells in the rhizosphere, while those on the leaves and in the soil were more likely to stay as spores or to sporulate again after a short phase of germination. Thus, plant sites are clearly different in their impact on the proportions of

dormant *Bacillus* in the population. Bacteria colonizing roots are significantly more active, strongly pointing toward the rhizosphere as being a key site for the establishment of a durable relationship between *B. subtilis* and/or *B. velezensis* and plants. These observations challenge the relevance of inoculating *Bacillus*-based biofertilizers on leaves since these spores do not appear to gain activities on this plant site. Inoculation directly into the soil, at root crown, or irrigation for the penetrance of bacteria will favor a better colonization of roots and the germination of spores into metabolically active cells. Understanding dynamics of the life cycle of *Bacillus* species used in commercial products in relation with crops for which they are used will allow us to improve how we use them. Such optimization should lead to an increase in the efficacy and reliability of various biofungicides and biopesticides used in organic agriculture.

### 3.2.7 Acknowledgments

The authors thank the company Plant Select (Saint-Paul d'Abbotsford, Québec, Canada) for the use of their facilities and the supply of plants, as well as Alain Baril and Stéphanie Théberge (Plant Select) for their support and help in this project. They also thank Alain Lavigueur for the critical reading of the manuscript. This work was supported by an NSERC Engage grant 522757 - 17.

### 3.2.8 Conflict of interest

The authors declare no conflict of interest.

### 3.2.9 References

Ahemad, M., and Kibret, M. 2014. Mechanisms and applications of plant growth promoting rhizobacteria: Current perspective. J. King Saud Univ. - Sci. 26(1): 1–20. King Saud University. doi:10.1016/j.jksus.2013.05.001.

Aktar, M.W., Sengupta, D., and Chowdhury, A. 2009. Impact of pesticides use in agriculture: their benefits and hazards. Interdisciplinary Toxicology 2(1): 1–12. doi:10.2478/v10102-009-0001-7.

Arkhipova, T.N., Veselov, S.U., Melentiev, A.I., Martynenko, E. V., and Kudoyarova, G.R. 2005. Ability of bacterium *Bacillus subtilis* to produce cytokinins and to influence the growth and endogenous hormone content of lettuce plants. Plant Soil 272(1–2): 201–209. doi:10.1007/s11104-004-5047-x.

Berg, G. 2009. Plant-microbe interactions promoting plant growth and health: Perspectives for controlled use of microorganisms in agriculture. Applied Microbiology Biotechnology 84(1): 11–18. doi:10.1007/s00253-009-2092-7.

Carvalho, F.P. 2017. Pesticides, environment, and food safety. Food and Energy Security 6(2): 48–60. Doi:10.1002/fes3.108.

Charron-Lamoureux, V., and Beaugard, P. 2019. *Arabidopsis thaliana* seedlings influence *Bacillus subtilis* spore formation. Molecular Plant-Microbe Interaction 32(9): 1188–1195. doi:10.1094/MPMI-10-18-0278-R.

Chen, Y., Yan, F., Chai, Y., Liu, H., Kolter, R., Losick, R., and Guo, J.H. 2013. Biocontrol of tomato wilt disease by *Bacillus subtilis* isolates from natural environments depends on conserved genes mediating biofilm formation. Environmental Microbiology 15(3): 848–864. doi:10.1111/j.1462-2920.2012.02860.x.

Chowdhury, S.P., Hartmann, A., Gao, X.W., and Borriss, R. 2015. Biocontrol mechanism by root-associated *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42 - A review. Frontiers in Microbiology 6(780). doi:10.3389/fmicb.2015.00780.

Fan, B., Wang, C., Song, X., Ding, X., Wu, L., Wu, H., Gao, X., and Borriss, R. 2018. *Bacillus velezensis* FZB42 in 2018: The gram-positive model strain for plant growth promotion and biocontrol. Frontiers in Microbiology 9(OCT): 1– Can. J. Microbiol. 14. doi:10.3389/fmicb.2018.02491.

Fierer, N. 2017. Embracing the unknown: Disentangling the complexities of the soil microbiome. Nature Review in Microbiology 15(10): 579–590. Nature Publishing Group. doi:10.1038/nrmicro.2017.87.

Garbeva, P., van Veen, J.A., and van Elsas, J.D. 2004. Microbial diversity in soil: selection microbial populations by plant and soil type and implications for disease suppressiveness. *Annual Review Phytopathology* 42: 243–70. doi:10.1146/annurev.phyto.42.012604.135455.

Hartmann, A., Rothballer, M., and Schmid, M. 2008. Lorenz Hiltner, a pioneer in rhizosphere microbial ecology and soil bacteriology research. *Plant Soil* 312(1–2): 7–14. Springer Netherlands. doi:10.1007/s11104-007-9514-z.

Hashem, A., Tabassum, B., and Fathi Abd\_Allah, E. 2019. *Bacillus subtilis*: A plant-growth promoting rhizobacterium that also impacts biotic stress. *Saudi Journal of Biological Science* 26(6): 1291–1297. King Saud University. doi:10.1016/j.sjbs.2019.05.004.

Hinsinger, P., Bengough, A.G., Vetterlein, D., and Young, I.M. 2009. Rhizosphere: Biophysics, Biogeochemistry and Ecological Relevance. *Plant Soil* 321(1–2): 117–152. doi:10.1007/s11104-008-9885-9.

Lécuyer, F., Bourassa, J.-S., Gélinas, M., Charron-Lamoureux, V., Burrus, V., and Beaugard, P.B. 2018. Biofilm formation drives transfer of the conjugative element ICEBs1 in *Bacillus subtilis*. *mSphere* 3(5): e00473-18.

Lindow, S.E., and Brandl, M.T. 2003. Microbiology of the phyllosphere. *Appl. Environmental Microbiology* 69(4): 1875–1883. doi:10.1128/AEM.69.4.1875-1883.2003.

Mendis, H.C., Thomas, V.P., Schwientek, P., Salamzade, R., Chien, J.T., Waidyarathne, P., Kloepper, J., and De La Fuente, L. 2018. Strain-specific quantification of root colonization by plant growth promoting rhizobacteria *Bacillus firmus* I-1582 and *Bacillus amyloliquefaciens* QST713 in non-sterile soil and field conditions. *PLoS One* 13(2): e0193119. doi:10.1371/journal.pone.0193119.

Moe, L.A. 2013. Amino acids in the rhizosphere: From plants to microbes. *American Journal of Botany* 100(9): 1692–1705. doi:10.3732/ajb.1300033.

Nicholson, W.L., and Setlow, P. 1990. Sporulation, germination and outgrowth. In *Molecular Biological Methods for Bacillus*. John Wiley and Sons Ltd, New York. pp. 391–431.

Nicolopoulou-Stamati, P., Maipas, S., Kotampasi, C., Stamatis, P., and Hens, L. 2016. Chemical pesticides and human health: The urgent need for a new concept in agriculture. *Frontiers in public health*. 4: 148. Frontiers Media S.A. doi:10.3389/fpubh.2016.00148.



Rudrappa, T., Czymmek, K.J., Pare, P.W., and Bais, H.P. 2008. Root-Secreted malic acid recruits beneficial soil bacteria. *Plant Physiology* 148(3): 1547–1556. doi:10.1104/pp.108.127613.

Turner. 2013. The Plant Microbiome. *Adv. Bot. Res.* 69: 279–309.

Yang, C.H., Crowley, D.E., Borneman, J., and Keen, N.T. 2001. Microbial phyllosphere populations are more complex than previously realized. *Proceedings of the National Acadademy of Sciences of the United States of America* 98(7): 3889–94.

Zeriouh, H., de Vicente, A., Pérez-García, A., and Romero, D. 2014. Surfactin triggers biofilm formation of *Bacillus subtilis* in melon phylloplane and contributes to the biocontrol activity. *Environmental Microbiology* 16(7): 2196–2211. doi:10.1111/1462-2920.12271.

Zhalnina, K., Louie, K.B., Hao, Z., Mansoori, N., Nunes da Rocha, U., Shi, S., Cho, H., Karaoz, U. et al. 2018. Dynamic root exudate chemistry and microbial substrate preferences drive patterns in rhizosphere microbial community assembly. *Nature Microbiology* 3(4): 470–480.

# CHAPITRE 4

## PULCHERRIMINIC ACID MODULATES IRON AVAILABILITY AND PROTECTS AGAINST OXIDATIVE STRESS DURING MICROBIAL INTERACTIONS

### 4.1 Introduction

#### 4.1.1 Pertinence

*B. subtilis* possède une multitude de traits adaptatifs lui permettant de résister à plusieurs facteurs biotiques et abiotiques, qui sont conférés entre autres par la formation d'un biofilm et la production d'un vaste arsenal de métabolites secondaires. Par ailleurs, *B. subtilis* produit un seul pigment, la pulcherrimine qui est observé de manière constitutive sur un milieu induisant le biofilm (MSgg). Sauf son implication dans le ralentissement de l'expansion du biofilm chez *B. subtilis* et de sa classification discutable comme sidérophore chez *Kluyveromyces lactis*, les rôles écologiques et physiologiques de la pulcherrimine restaient inexplorés. À l'aide d'approches de microbiologie et de chimie analytique, nous avons montré que la pulcherrimine fait partie d'un nouveau système de gestion du Fe.

Nous avons d'abord décrit que *B. subtilis* produit l'acide pulcherriminique (PA) et sa forme complexée au Fe(III), la pulcherrimine, suite à son interaction compétitive avec *Pseudomonas protegens* Pf-5, mais pas en présence d'autres espèces de *Pseudomonas*. Des expériences de croissance et de formation de biofilm à l'aide d'un mutant incapable de produire la PA ( $\Delta yvmC$ ) ont montrés qu'en absence de PA la survie et le biofilm de *B. subtilis* sont diminués en présence de l'espèce compétitrice. Par analyse colorimétrique et analytique, nous avons ensuite élucidé le mécanisme

moléculaire de récupération du Fe(III) piégé dans le complexe précipité qu'est la pulcherrimine. Finalement, nous avons démontré les propriétés antioxydantes de la PA grâce à l'utilisation d'une sonde réactive aux ROS et des propriétés redox du Fe lié à la PA en faisant une expérience de voltammétrie cyclique.

En plus d'élucider en profondeur les mécanisme biologique et chimique de formation de pulcherrimine chez *B. subtilis*, cet article aborde plusieurs concepts novateurs. Nous montrons que la pulcherrimine est au centre d'un mécanisme contre-intuitif qui capitalise sur la précipitation active du Fe créant ainsi une ressource locale pouvant être miné par l'utilisation des sidérophores, ce qui a de grandes implications pour la compréhension de la gestion du Fe dans le sol. Aussi, la capacité antioxydante de cette molécule révèle un nouveau système bactérien de protection contre les ROS extracellulaires.

#### 4.1.2 Apport des auteurs

J'ai conceptualisé l'entièreté de cette étude et ai défini l'approche expérimentale sous les conseils de Pascale B. Beauregard et de Jean-Philippe Bellenger. J'ai réalisé la quasi-totalité des expériences et des analyses et ai été impliqué dans toutes les expériences qui ont mené aux conclusions de cet article. Lounès Haroune a établi le protocole de purification de la bacillibactine et effectué les essais de dissolution *in vitro* avec la plateforme de spectrométrie de masse à l'institut de pharmacologie de l'Université de Sherbrooke. Maude Pomerleau a confirmé certaines expériences (Figures 3.2 et 3.6) en faisant au moins un répliqua biologique. Léo Hall et Frédéric Orban ont synthétisé l'acide pulcherriminique dans le laboratoire de Claude Y. Legault. Julie Leroux a performé les essais de voltammétrie cyclique sous la supervision de Nicolas Fontaine et Élodie V. d'Astous dans le laboratoire de Philippe Dauphin-Ducharme.

J'ai rédigé la première version de l'article, produit toutes les figures, fait les analyses statistiques et participé à l'édition du manuscrit avec Pascale B. Beauregard et Jean-Philippe Bellenger. Le manuscrit a été critiqué et relu par Philippe Dauphin-Ducharme, Claude Y. Legault et Lounès Haroune ainsi que François M. M. Morel et Anne M. Kraepiel-Morel situés à l'Université de Princeton.

#### 4.1.3 Référence

**Charron-Lamoureux V**, Haroune L, Pomerleau M, Hall L, Orban F, Leroux L, Rizzi A, Bourassa JS, Fontaine N, d'Astous EV, Dauphin-Ducharme P, Legault CY, Bellenger JP, Beauregard PB. (2023) Pulcherriminic acid modulates iron availability and protects against oxidative stress during microbial interactions. *Nat commun.* 14 (1), 2536.

Mots clés : Pulcherrimin, *Bacillus*, *Pseudomonas*, fer, compétition, stress oxydatif

## 4.2 Article

### 4.2.1 Page titre

#### **Pulcherriminic acid modulates iron availability and protects against oxidative stress during microbial interactions.**

Vincent Charron-Lamoureux, Lounès Haroune, Maude Pomerleau, Léo Hall, Frédéric Orban, Julie Leroux, Adrien Rizzi, Jean-Sébastien Bourassa, Nicolas Fontaine, Élodie V. d'Astous, Philippe Dauphin-Ducharme, Claude Y. Legault, Jean-Philippe Bellenger & Pascale B. Beaugard.

#### 4.2.2 Abstract

Siderophores are soluble or membrane-embedded molecules that bind the oxidized form of iron, Fe(III), and play roles in iron acquisition by microorganisms. Fe(III)-bound siderophores bind to specific receptors that allow microbes to acquire iron. However, certain soil microbes release a compound (pulcherriminic acid, PA) that, upon binding to Fe(III), forms a precipitate (pulcherrimin) that apparently functions by reducing iron availability rather than contributing to iron acquisition. Here, we use *Bacillus subtilis* (PA producer) and *Pseudomonas protegens* as a competition model to show that PA is involved in a peculiar iron-managing system. The presence of the competitor induces PA production, leading to precipitation of Fe(III) as pulcherrimin, which prevents oxidative stress in *B. subtilis* by restricting the Fenton reaction and deleterious ROS formation. In addition, *B. subtilis* uses its known siderophore bacillibactin to retrieve Fe(III) from pulcherrimin. Our findings indicate that PA plays multiple roles by modulating iron availability and conferring protection against oxidative stress during inter-species competition.

#### 4.2.3 Introduction

Iron (Fe) is an essential metal required in high cellular concentrations for the survival and growth of most living organisms on earth. While abundant in soil, its solubility and, hence its bioavailability are very low at circumneutral pH (ca  $10^{-10}$  M)<sup>1</sup>. To solve this conundrum of high demand but low supply, soil bacteria produce siderophores—low molecular-weight compounds with high affinity for Fe(III)<sup>2</sup>. Specific transport systems allow Fe to be taken by cells and utilized in various cellular pathways and proteins<sup>3,4,5</sup>. Soil microorganisms often compete for Fe and have evolved mechanisms to maximize Fe acquisition, including the production of multiple siderophores with a range of affinities for Fe and the expression of various receptors at the cell surface capable of binding siderophores, sometimes including xenosiderophores<sup>6,7,8,9</sup>. In interspecies

competition, secretion of siderophore can confer growth advantage through rapid Fe monopolization<sup>10</sup>. However, Fe sequestration by siderophores can be a double-edged sword as competitors can also cheat them, thus acquiring Fe without sharing the metabolic cost of siderophore biosynthesis<sup>9,11</sup>.

Using the same synthesis pathway, *B. subtilis* produces two siderophores: the relatively weak binding-affinity 2,3-dihydroxybenzoic acid (DHB; one catechol function) and the strong binding-affinity bacillibactin (BB; three catechol function)<sup>12</sup>. Pulcherriminic acid (PA), another Fe-chelating molecule produced by yeast and many bacteria including *B. subtilis*<sup>13,14,15</sup>, harbors two hydroxamate groups and forms the red insoluble pulcherrimin complex upon binding Fe(III)<sup>15,16,17</sup>. Recently, the extracellular accumulation of pulcherrimin (PA-Fe) was shown to restrict biofilm expansion, and it was suggested that PA act as an intercellular signal triggering the transition from exponential to stationary phase in *B. subtilis*<sup>14,18</sup>. Pulcherrimin was first described in a small group of yeasts, including *Candida* spp. and *Kluyveromyces* spp.<sup>15,19</sup>. In these organisms, PA production was shown to have antagonistic activity, probably through Fe depletion<sup>20</sup>. In *Kluyveromyces lactis*, it was suggested that PA might act as a siderophore, a contradictory idea since the pulcherrimin complex is insoluble and, apparently, not a bioavailable source of Fe<sup>19,21</sup>. Indeed, nearly all previous studies in yeast and *Bacillus* stipulate that PA irreversibly binds Fe(III) and thus plays no role in Fe acquisition.

Another important aspect of Fe homeostasis in *B. subtilis* is the formation of a biofilm. We previously showed that both the biofilm matrix and siderophore production are necessary for the organism to acquire Fe from precipitated oxides<sup>22</sup> and that biofilm-bound Fe can be used as a local Fe source<sup>23</sup>. Another study demonstrated the importance of Fe(III) in the deep layer of the biofilm, serving as a terminal electron acceptor in the absence of oxygen<sup>24</sup>. Biofilm-bound Fe thus appears essential for biofilm function in addition to cell growth. Siderophores and biofilm formation contribute to Fe acquisition and homeostasis in biofilm-forming bacteria<sup>22,25</sup>. However, little is

known on the ecological advantage of secreting precipitating ligands such as PA in the context of microbial competition and the Fe's fate once complexed to PA.

In this work, we used a two-species bacterial model to investigate the role of pulcherrimin, if any, in the iron war. *Bacillus* and *Pseudomonas* are two genera often found together in the rhizosphere, where they interact with plant roots but also likely compete for the same resources. Indeed, many antagonistic interactions were demonstrated between *B. subtilis* and various *Pseudomonas* species<sup>26,27</sup>. However, less is known regarding nutrient acquisition, particularly Fe, during the competition between *Bacillus* and *Pseudomonas* genera. Here, using a two-species bacterial model, *Bacillus subtilis* (PA producer) and various *Pseudomonas* species, we show that *B. subtilis* produces PA in pairwise interaction with *Pseudomonas protegens* Pf-5, creating a local source of precipitated Fe(III) and is able to take up Fe from the pulcherrimin complex via the production of the strong Fe-chelator bacillibactin (BB). We also show that pulcherrimin mitigates oxidative stress in this organism, increasing survival and biofilm formation while in competition with Pf-5. Our observations provide a new understanding of the physiological role of pulcherrimin, which is neither a siderophore nor an inaccessible Fe sequester, but instead provides a local Fe source while preventing deleterious reactive oxygen species formation.

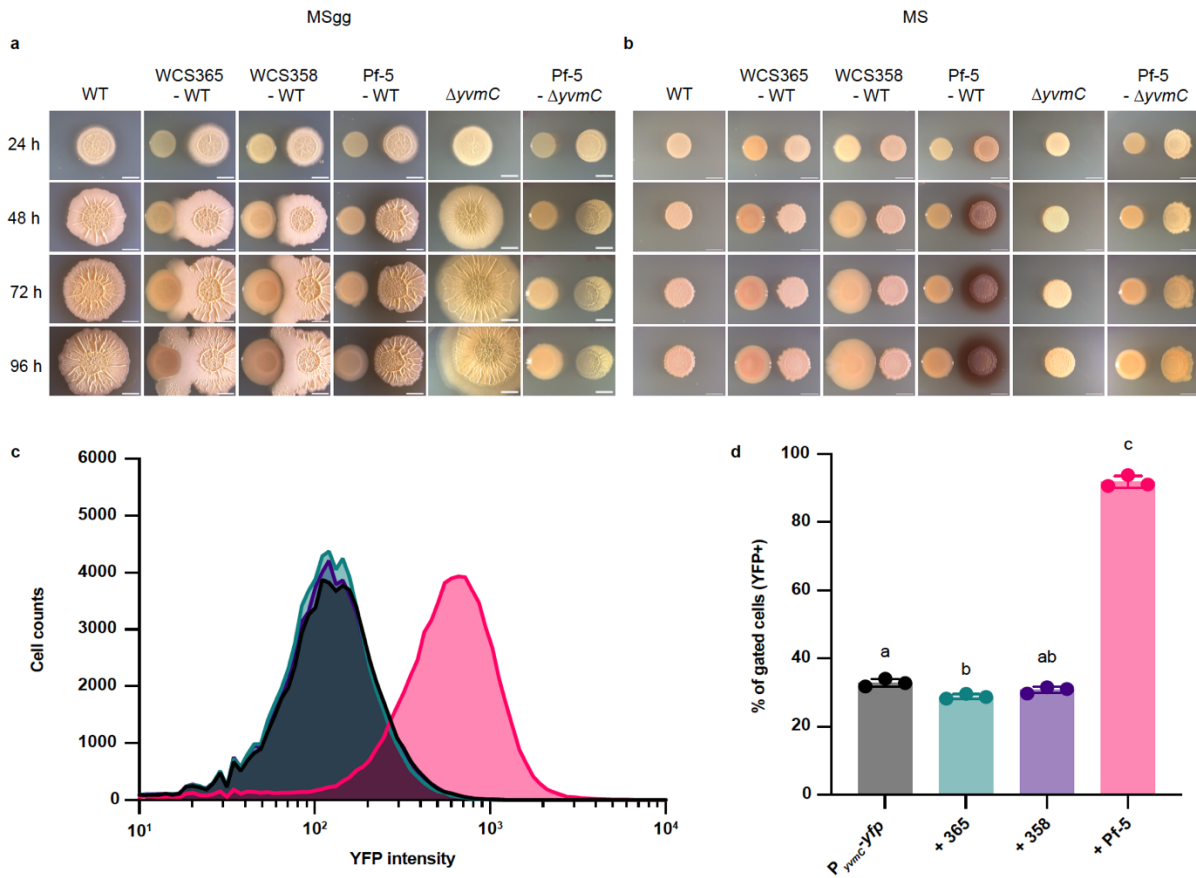
#### 4.2.4 Results

##### 4.2.4.1 *P. protegens* Pf-5 triggers pulcherriminic acid production in *B. subtilis*

To explore the defensive strategies used by *B. subtilis* in interaction with other soil bacteria, we performed time-course pairwise interaction assays between *B. subtilis* NCIB 3610 and three *Pseudomonas* species (*P. fluorescens* WCS365, *P. capeferrum* WCS358, and *P. protegens* Pf-5) isolated from the rhizosphere and used as biocontrol agents in crops<sup>28,29</sup>. These three *Pseudomonas* species were chosen for



their differences in secondary metabolites production<sup>30,31,32</sup>. The interactions were examined on two different media: MSgg, commonly used to study biofilm formation in *B. subtilis* and which was previously used in *Bacillus* spp. – *Pseudomonas* pairwise interactions<sup>27</sup>, and Murashige and Skoog medium (MS), commonly used to grow plants and examine their interactions with beneficial bacteria. Here, MS was supplemented with glycerol and glutamate to promote *B. subtilis* biofilm formation<sup>33</sup>. In MSgg Fe is provided as salt (FeCl<sub>3</sub>; inorganic), which under oxic conditions forms ferric hydroxides and oxides that precipitate. In MS, Fe is provided as an organic complex (Fe-EDTA) which retains its solubility through time. Nonetheless, in both conditions, Fe is not readily bioavailable for *B. subtilis*. Over time on MSgg, *B. subtilis* engulfed both *P. fluorescens* WCS365 and *P. capeferrum* WCS358, but *B. subtilis* and Pf-5 colonies did not establish a physical contact suggesting antagonistic activities mediated by diffusible molecules (Figure 4.1a). Side-by-side colonies on MS display a lack of interaction, except for a red halo which surrounded *B. subtilis* colony in competition with Pf-5 (Figure 4.1b). This red halo was absent when *B. subtilis* was alone on MS, but always present on MSgg, as described earlier<sup>14</sup> (Figure 4.1a). Pulcherriminic acid (PA) is the sole known pigment produced by *B. subtilis*<sup>14</sup>. It is colorless but forms the red insoluble pulcherrimin complex upon Fe(III) binding outside the cell<sup>34</sup>. *B. subtilis* deleted for *yvmC*, a gene encoding the protein responsible for PA synthesis, challenged with Pf-5 on both media (MS and MSgg) lacked production of the red pigment under all conditions (Figures 4.1a, b). Complementation of the *yvmC-cypX* operon at the *amyE* locus restored pigment synthesis (Supplementary Figure S4.1a), demonstrating that the “red” phenotype is due to PA production.



**Figure 4.1.** *P. protegens* Pf-5 triggers pulcherriminic acid secretion in *B. subtilis*.

**a** Representative images of biofilms from *B. subtilis* WT and  $\Delta yvmC$ , in competition with *Pseudomonas* WCS365, WCS358, and Pf-5. Pictures were taken at regular intervals on MSgg and on **(b)**, MS medium. Images contrast was adjusted to allow clear visualization. **c** Flow cytometry analysis showing the distribution of fluorescence intensity of YFP-based transcriptional reporter for *yvmC* alone (black) against *Pseudomonas* species WCS365 (teal), WCS358 (purple), and Pf-5 (pink). **d** *B. subtilis* harboring the fluorescent reporter for PA production ( $P_{yvmC}$  - *yfp*) was grown on MS for 24 h with and without *Pseudomonas* species. The percentage of fluorescent cells (YFP +) was analyzed by flow cytometry.

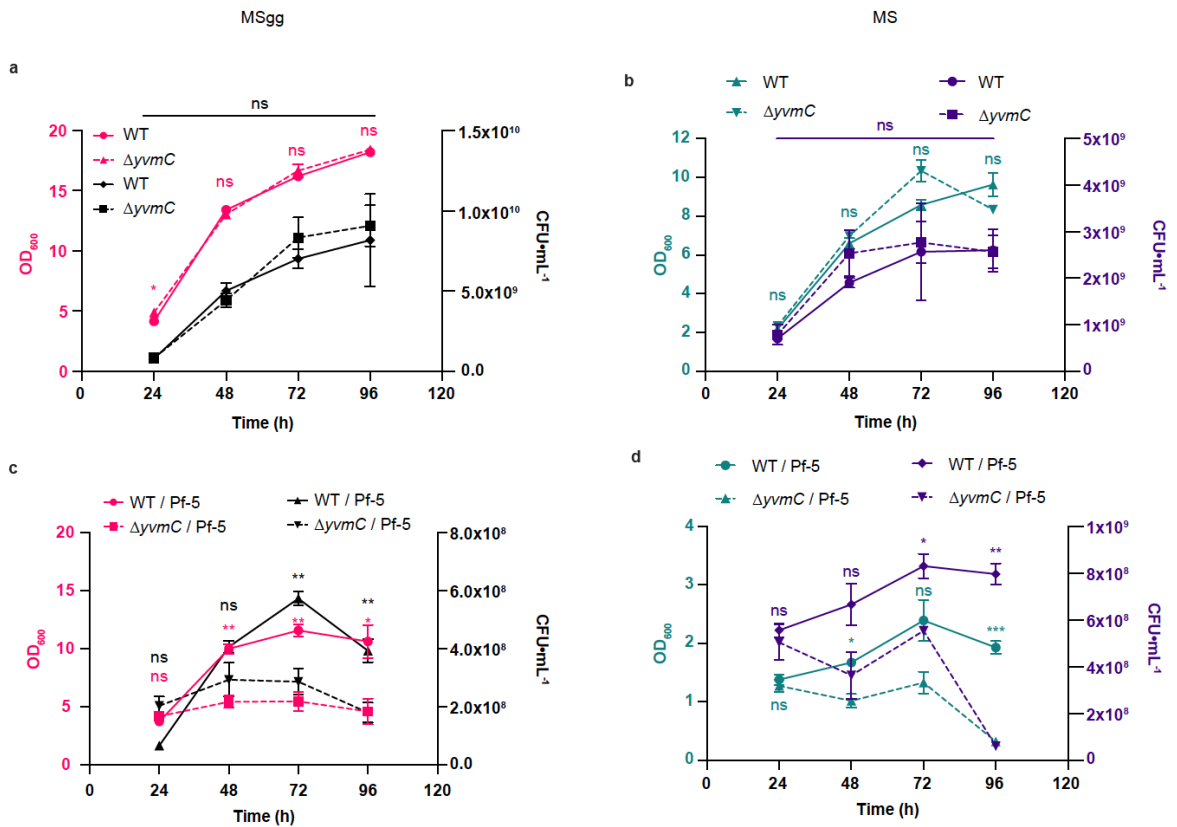
All experiments were performed in three biological replicates with three technical replicates. Representative experiments and pictures are presented. Different letters indicate statistically significant differences,  $P < 0.05$ , one-way ANOVA and Tukey's multiple comparisons test. Data are presented as mean values  $\pm$  SD,  $n = 3$ . Scale bar, 5 mm. Source data are provided as a Source Data file.

On MSgg, *B. subtilis* displayed a strong and uniform expression of the  $P_{yvmC}$ -*yfp* bioreporter across the biofilm (Supplementary Figures 4.2a, b). In contrast on MS, only *B. subtilis* cells next to Pf-5 displayed  $P_{yvmC}$ -*yfp* expression, and thus, PA production (Supplementary Figure 4.2c). Flow cytometry analysis of the proportion of cells expressing  $P_{yvmC}$ -*yfp* confirmed a clear population shift when *B. subtilis* was grown close to Pf-5 with almost ~95% of YFP+, compare to only ~30% for *B. subtilis* colonies grown in the presence of WCS365 or WCS358 (Figures 4.1c, d).

Pf-5 is known to secrete secondary metabolites detrimental to *B. subtilis*, including 2,4-DAPG and pyoluteorin<sup>27,35</sup>, which could be responsible for triggering PA production. Challenging *B. subtilis* with Pf-5  $\Delta phlD$  mutant, unable to synthesize these two secondary metabolites<sup>36</sup>, did not significantly decrease the number of cells expressing *yvmC* ( $P_{yvmC}$ -*yfp* reporter) (Supplementary Figure 4.1c). However, cells were expressing  $P_{yvmC}$ -*yfp* to a lesser degree compared to WT when in presence of Pf-5, which suggests that either DAPG or pyoluteorin might be involved in PA production (Supplementary Figure 4.1b). Spiking DAPG close to *B. subtilis* colony triggered  $P_{yvmC}$ -*yfp* expression (Supplementary Figure S4.2d). Interestingly, after removing a slice of agar between 3610 and Pf-5 to eliminate the influence of medium-diffusible molecules, ~70% of cells in the population were still expressing  $P_{yvmC}$ -*yfp* (Supplementary Figure S4.1c). Failing to directly pinpoint all the molecules responsible for triggering PA production, our observations suggest that it results from an effect of both volatiles and medium-diffusible secondary metabolites from Pf-5.

#### 4.2.4.2 *Pulcherrimin is important for the survival of B. subtilis in interspecies interaction*

On both media, in the absence of Pf-5, the WT and  $\Delta yvmC$  (PA mutant) displayed no significant differences in biofilm phenotypes, growth curve, and biomass (Figure 4.2a, b) except on MSgg at later time points where  $\Delta yvmC$  kept expanding as previously observed (Figure 4.1a, b)<sup>14</sup>. However, Pf-5 impeded biofilm formation in WT on both media, and this effect was exacerbated in  $\Delta yvmC$  mutant, observed by a lack of wrinkles in the presence of Pf-5 (Figure 4.1a, b). Furthermore, Pf-5 completely stopped the growth and survival of  $\Delta yvmC$  (Figure 4.2c, d). Together, these findings demonstrated that secretion of PA protects *B. subtilis* cells and allows biofilm formation against Pf-5.

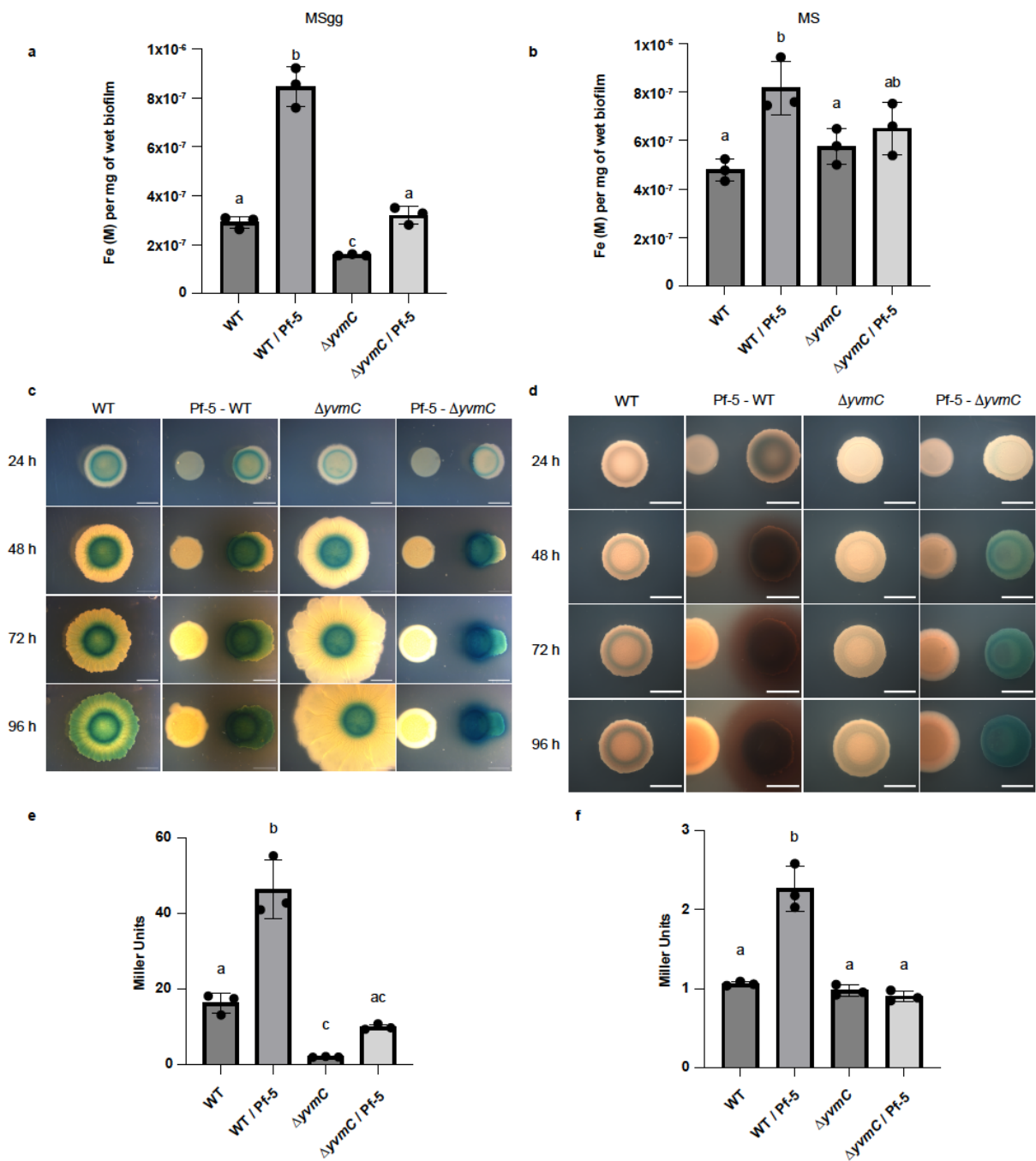


**Figure 4.2 Pulcherrimin is important for *B. subtilis* survival and biofilm formation.**

**a** CFU counts and biomass ( $OD_{600}$ ) of WT and  $\Delta yvmC$  alone on MSgg (ns non-significant,  $*P = 1.82 \times 10^{-2}$ ) and **(b)**, on MS (ns non-significant). **c** CFU counts and biomass ( $OD_{600}$ ) of WT and  $\Delta yvmC$  with Pf-5 on MSgg (ns non-significant,  $** = P < 0.01$ ) and **(d)**, on MS. (ns non-significant,  $*P < 0.05$ ,  $**P < 0.01$ ,  $***P = 8.93 \times 10^{-4}$ , two-way ANOVA, sidak's). All experiments were performed in three biological replicates with three technical replicates. Representative experiments are presented. Data are presented as mean values  $\pm$  SD,  $n = 3$ . Source data are provided as a Source Data file.

#### 4.2.4.3 *Pf-5 and pulcherrimin trigger $P_{dhbA}$ -lacZ expression, and Pf-5 presence increases Fe load in *B. subtilis* biofilm*

Secretion of a strong and insoluble Fe chelator such as pulcherriminic acid could affect Fe accumulation in the biofilm. Thus, the total Fe content present in the colonies (biofilms + cells) and cells (intracellular Fe content) of *B. subtilis* WT and  $\Delta yvmC$  mutant (PA mutant) was quantified. There was a slight diminution of Fe accumulation in  $\Delta yvmC$  biofilm ( $1.58E-7$  M) compared to the WT alone ( $2.92E-7$  M) in MSgg medium when PA is highly produced (Figure 4.3a), while the intracellular Fe contents remained similar (Supplementary Figure S4.3a). On the same medium, *B. subtilis* WT in the presence of Pf-5 showed ~ 3-fold increase in Fe content in the colonies (biofilms + cells) compared to WT alone ( $8.45E-7$  M), but the intracellular Fe contents did not differ significantly (Supplementary Figure S4.3a). Also, the  $\Delta yvmC$  mutant in presence of Pf-5 accumulated significantly more Fe in the colonies ( $3.20E-7$  M) compared to  $\Delta yvmC$  ( $1.58E-7$  M), but significantly less than the WT next to Pf-5 (Figure 4.3a). These results imply that pulcherrimin production favors the extracellular accumulation of Fe in the biofilm. This observation was confirmed by an increased Fe accumulation in MS in the WT biofilm in the presence of Pf-5, which stimulates PA production in the MS medium (Figure 4.3b). In MS only, the difference between PA producer and non-producer was not significant in both the colonies and intracellularly (Figure 4.3b; Supplementary Figure S4.3b).



**Figure 4.3. Pf-5 and pulcherrimin trigger bacillibactin synthesis and Pf-5 presence increases Fe load in *B. subtilis* biofilm.**

**a** Fe content (in molar; M), normalized on mg of wet biofilms, of 48 h colonies formed on MSgg and **(b)**, on MS medium. **c** Bottom-view

pictures of *B. subtilis* harboring the  $\beta$ -galactosidase gene transcriptional reporter for DhbA production ( $P_{dhbA}$ -*lacZ*) grown on MSgg and (d), on MS medium. Images contrast was adjusted to allow clear visualization. e  $\beta$ -galactosidase activities of WT and  $\Delta yvmC$  harboring the  $P_{dhbA}$ -*lacZ* reporter alone and in interaction with Pf-5 in MSgg at 48 h (f), and in MS at 24 h. Experiments were performed in three biological replicates with three technical replicates. Different letters indicate statistically significant differences,  $P < 0.05$ , one-way ANOVA and Tukey's multiple comparisons test. Data are presented as mean values  $\pm$  SD,  $n = 3$ . Scale bar, 5 mm. Source data are provided as a Source Data file.

The maintenance of intracellular Fe homeostasis (Supplementary Figure S4.3) despite the formation of the insoluble PA-Fe complex suggests the presence of a strong siderophore production. To examine this hypothesis, a *B. subtilis* strain harboring  $P_{dhbA}$ -*lacZ*, a  $\beta$ -galactosidase transcriptional reporter of the DHB and BB biosynthesis operon, was used. A colony grown for 24 h on MSgg displayed a small blue ring in its center, and this ring rapidly darkened over time, suggesting Fe limitation as a result of Fe precipitation (Figure 4.3c). Interestingly, after 96 h  $P_{dhbA}$ -*lacZ* signal was also visible at the outer ring of the WT but not in  $\Delta yvmC$  (Figure 4.3c), which likely results from Fe sequestration by pulcherrimin as described in an earlier study<sup>14</sup>. The  $P_{dhbA}$ -*lacZ* expression was also quantified at 48 h on MSgg where the WT showed increased level of LacZ activity in presence of Pf-5 when PA is produced abundantly (Figure 4.3e). The  $\Delta yvmC$  mutant showed reduced LacZ activity compared to WT, but an increase was observed next to Pf-5 suggesting siderophore production by the competing colony (Figure 4.3e). In MS medium, where Fe is kept in solution by EDTA,  $P_{dhbA}$ -*lacZ* appeared very weakly expressed (Figure 4.3d). In the presence of Pf-5, on both media, the WT displayed a dark blue coloration (Figure 4.3c, d). A clear physical gradient of Fe starvation could be observed on WT with Pf-5 in MS medium since the cells facing the Pf-5 colonies were a much darker hue than the rest of the colony (Supplementary Figure S4.4a). The  $P_{dhbA}$ -*lacZ* expression was also quantified at 24 h

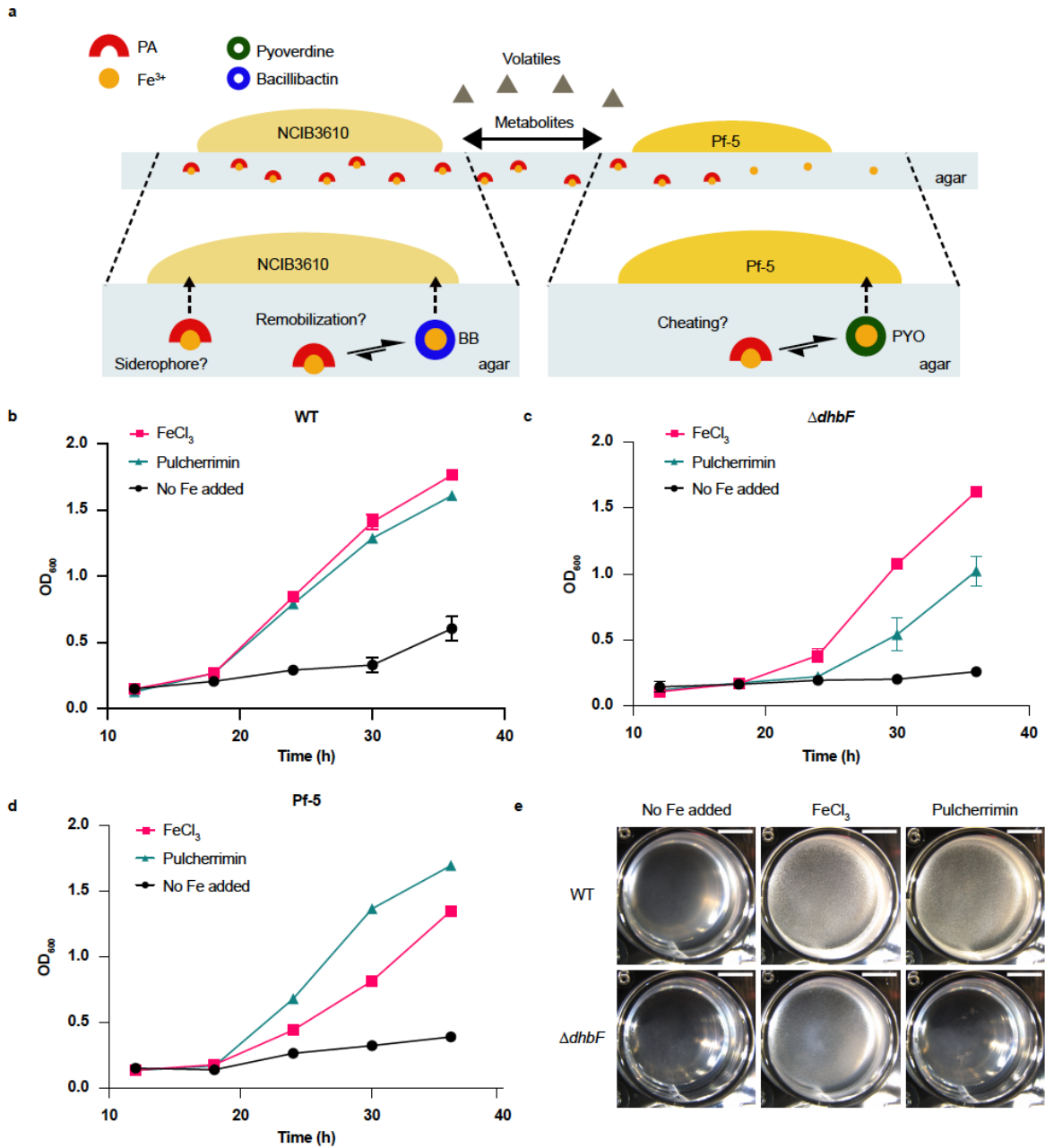


on MS medium to confirm that the  $P_{dhbA-lacZ}$  expression was increased only when PA is highly produced (Figure 4.3f). To validate the contribution of pulcherrimin in stimulating *dhbA* transcription, the mutant  $\Delta pchR$  (the negative regulator of PA synthesis) was used. As expected,  $\Delta pchR$  experienced severe Fe starvation, as demonstrated by a strong expression of *lacZ* under and on top of the biofilm (Supplementary Figures S4.4a–c). Moreover, even if pulcherrimin accumulation triggered *dhbA* expression, the presence of Pf-5 was necessary to achieve strong *dhbA* expression throughout the biofilm (Supplementary Figure S4.4b). These findings demonstrate that a combination of Pf-5 and pulcherrimin production creates a Fe stress eliciting strong  $P_{dhbA-lacZ}$  expression by *B. subtilis* cells suggesting more DHB and BB synthesis.

#### 4.2.4.4 *Bacillibactin siderophore is key to mobilizing pulcherrimin-bound Fe*

The maintenance of WT growth in the presence of Pf-5 in MS, despite the fact that Fe(III) is chelated in the insoluble pulcherrimin complex, raises questions on how *B. subtilis* acquires Fe under those conditions. Hence, we present a conceptual framework summarizing two possible ways for Fe recovery in the presence of pulcherrimin (Figure 4.4a). First, the PA-Fe complex could be taken up by *B. subtilis* cells, confirming its role as a siderophore as previously suggested<sup>19</sup>. Alternatively, Fe might be remobilized by the strong BB siderophore, which is overproduced under these conditions. Similarly, Pf-5 might retrieve Fe from pulcherrimin owning the production of the proper tool (i.e., the high-affinity Fe ligand pyoverdine). As seen in Figure 4.4b, the addition of either FeCl<sub>3</sub> or pulcherrimin restored *B. subtilis* WT growth (monitored as OD<sub>600</sub>) compared to Fe depleted condition. Repeating this experiment with a  $\Delta dhbF$  mutant, unable to catalyze the last step of BB synthesis, demonstrated a clear growth defect in the presence of pulcherrimin as the sole Fe source but not in the presence of FeCl<sub>3</sub> in accordance with a previous study (Figure 4.4c)<sup>12,24</sup>. Finally, a  $\Delta dhbA-F$  mutant, which is unable to produce neither DHB nor BB, could not grow in

presence of pulcherrimin and  $\text{FeCl}_3$  but was able to grow in presence of Fe-citrate (Supplementary Figure S4.5). This result suggests that pulcherrimin is not a siderophore per se and that siderophores are required for the acquisition of pulcherrimin-bound Fe. Similarly, *B. subtilis* WT, but not the  $\Delta dhbF$  mutant, can use pulcherrimin as a sole Fe source for forming the Fe-rich pellicle (Figure 4.4e), a process that requires a large amount of  $\text{Fe}^{37}$ .



**Figure 4.4. Bacillibactin siderophore is key to mobilizing pulcherrimin-bound Fe.**

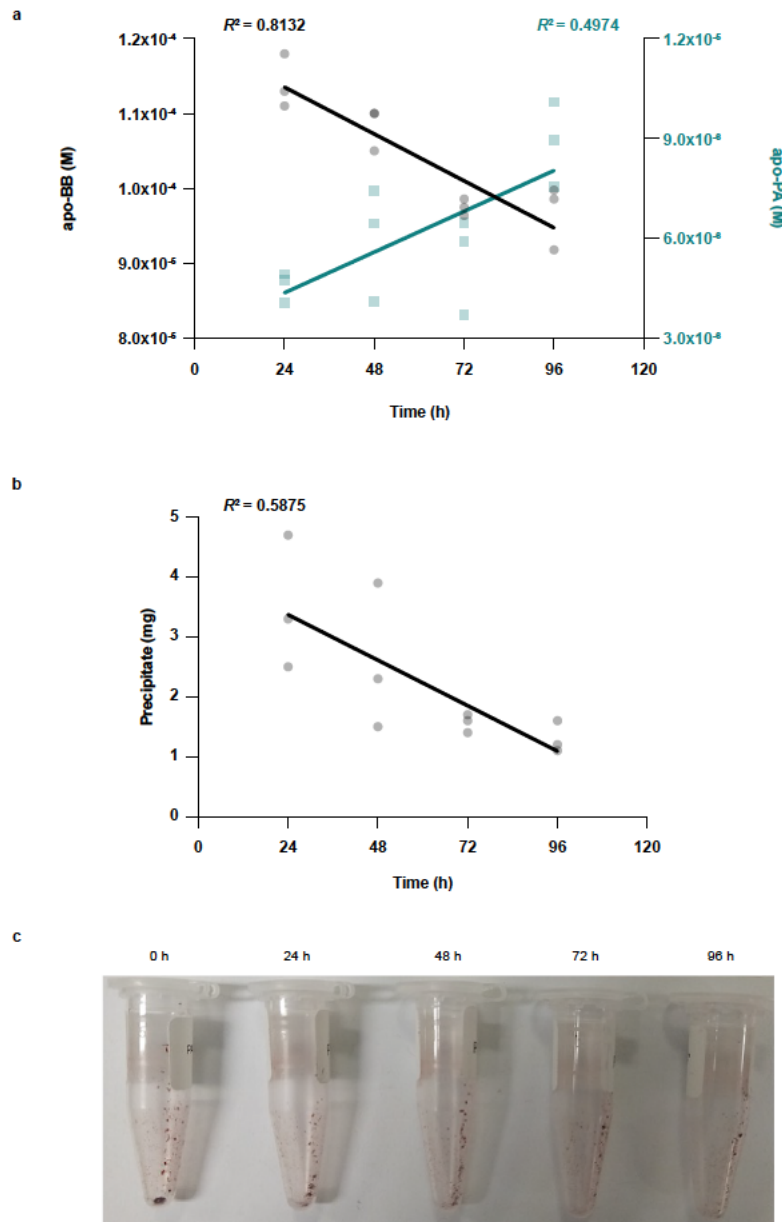
a Conceptual framework in MSgg showing the possible route of Fe recovery. Pulcherrimin could be uptake as a complex (siderophore), or Fe

trapped in pulcherrimin could be remobilized by a stronger siderophore (BB) based on affinity constant. A foreign species (Pf-5) could strip Fe from pulcherrimin and use it as an Fe source. **b**, *B. subtilis* WT growth was monitored (by absorbance at OD<sub>600</sub>) in MSgg medium. Optical density was measured every 6 h starting at 12 h post-inoculation (12 h, 18 h, 24 h, 30 h, and 36 h) in presence of no added Fe (control), 50 μM FeCl<sub>3</sub>, and 50 μM pulcherrimin as Fe sources. **c** The growth of  $\Delta dhbF$  was monitored as in (a). **d** The competitive strain *P. protegens* Pf-5 growth was evaluated as in (a). **e** Pellicle formation assays were performed to evaluate the biofilm robustness in the presence of no added Fe, 50 μM FeCl<sub>3</sub>, and 50 μM pulcherrimin as Fe sources. Pellicles were cultivated in a 24-well plate and pictures were taken 24 h later. Scale bar (top upper right—5 mm). All experiments were performed in three biological replicates with three technical replicates. Representative experiments and pictures are presented. Data are presented as mean values  $\pm$ SD,  $n = 3$ . Source data are provided as a Source Data file.

Since sequestering Fe in pulcherrimin does not prevent Fe acquisition by *B. subtilis*, it might starve Pf-5 by monopolizing Fe (Figure 4.4a). Surprisingly, Pf-5 still displayed strong growth in the presence of either pulcherrimin or FeCl<sub>3</sub> compared to MSgg without Fe (Figure 4.4d), showing that pulcherrimin-bound Fe can be used by the competing Pf-5.

To confirm that pulcherrimin-bound Fe(III) was remobilized by BB, an *in vitro* dissociation assay was performed. This experiment requires high-quality purified compounds, which is not attainable with the harsh steps of the pulcherrimin purification procedure. Hence, the apo-PA was synthesized to obtain the soluble molecule (see supplementary data for synthesis details; see supplementary Figure S4.6 for chemical structures). The addition of Fe(III) to the apo-PA led to the formation of a red, flaky precipitate at a 3:1 ratio (PA: Fe) (Figure 4.5c). First, pulcherrimin (i.e., Fe-PA) was mixed with apo-BB in

a 1:1 ratio based on Fe binding capacity, and the evolution of Fe binding by BB and re-solubilization of PA due to dissociation over time was followed using UPLC-MS. As seen in Figure 4.5a, a decrease of apo-BB and an increase of apo-PA were observed. The apo-PA in absence of BB was quantified every 24 h until 96 h and the pulcherrimin precipitates were weighted at T = 0 and T + 96 h to evaluate their stability. No significant changes were observed (Supplementary Figure S4.7), confirming that BB dissociated pulcherrimin by binding Fe and solubilizing the precursor, PA. The size of pulcherrimin aggregates also decreased over time and can be visualized (Figure 4.5c). In parallel, the dry precipitate was weighted, and a decrease in pulcherrimin mass was observed, going from  $3.50 \pm 1.11$  mg to  $1.30 \pm 0.26$  mg after 96 h confirming the dissociation of pulcherrimin by BB (Figure 4.5b).



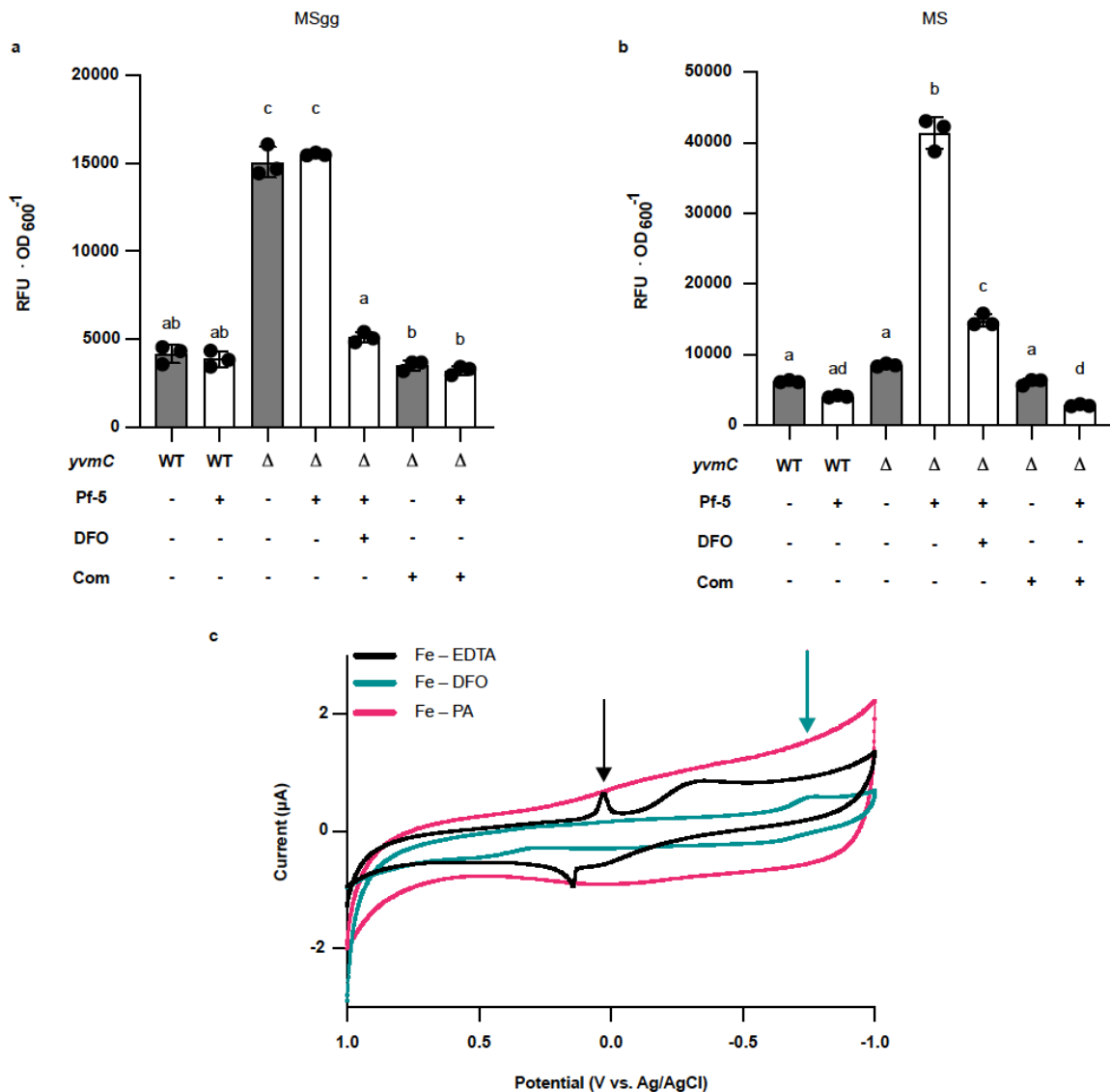
**Figure 4.5. Bacillibactin mobilizes pulcherrimin-bound Fe.**

**a** Apo-BB was mixed with precipitated pulcherrimin at a 1:1 ratio. Apo-siderophores (BB and PA) were quantified by UPLC-MS and samples were collected at 24 h, 48 h, 72 h, and 96 h.  $n = 12$ . **b** Tubes were

centrifuged and dried to determine the mass of the precipitate over time.  $n = 12$ . **c** Images were taken at 0, 24 h, 48 h, 72 h, and 96 h to visualize pulcherrimin dissociation.  $n = 3$ . Source data are provided as a Source Data file.

#### 4.2.4.6 *Immobilization of Fe(III) by PA prevents oxidative stress in the biofilm*

*B. subtilis* requires a large amount of Fe for biofilm formation, but Fe overload is known to cause detrimental effects to cells in the presence of oxygen<sup>38</sup>. Consequently, tight regulation is needed to prevent the reduction-oxidation (redox) cycle and the Fenton and Fenton-like reaction occurring in these conditions. The precipitation of pulcherrimin creates a large pool of local Fe(III), accessible through BB complexation (see above), while possibly preventing the accumulation of reactive oxygen species (ROS). ROS levels were quantified extracellularly and intracellularly in the WT and the  $\Delta yvmC$  mutant using the 2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate (DCFH<sub>2</sub>-DA) probe. DCFH<sub>2</sub>-DA is a widely used fluorescent probe for the detection of general oxidative stress<sup>39,40</sup>. As seen in Figures 6a, b, WT biofilms showed low ROS levels on MSgg, where PA is secreted in high amounts, and on MS medium, where PA production is minimal. In contrast, the  $\Delta yvmC$  mutant showed high ROS levels in MSgg but not in MS medium, indicating that PA production and subsequent pulcherrimin formation are responsible for controlling oxidative stress on MSgg both extracellularly and intracellularly (Supplementary Figures S4.8a–d). Complementation in *trans* of the  $\Delta yvmC$  reduced ROS levels similar to WT (Figure 4.6a, b).



**Figure 4.6. Pulcherrimin prevents oxidative stress in biofilm by immobilizing Fe(III).**

**a** Quantification of general oxidative stress (ROS) using the DCFH<sub>2</sub>-DA probe in MSgg medium. Fluorescence intensities were normalized on biomass (OD<sub>600</sub>). DFO indicates that the siderophore deferoxamine mesylate was added to chelate Fe; Com indicates the complementation



by *amyE::P<sub>yvmC</sub>-yvmC-cypX* in the  $\Delta yvmC$  mutant background. Experiments was performed in three biological replicates with three technical replicates. **b** Same as in (a), except that the experiment was conducted in MS medium. Experiments was performed in three biological replicates with three technical replicates. Data are presented as mean values  $\pm$ SD,  $n = 3$ . Different letters indicate statistically significant differences,  $P < 0.05$ , one-way ANOVA and Tukey's multiple comparisons test. Gray strips indicate absence of Pf-5 and white strips indicate presence of Pf-5. **c** Cyclic voltammetry profile curves of Fe(III)-EDTA (black line; the arrow indicates the Fe reduction peak), Fe(III)-DFO (teal line; the arrow indicates the Fe reduction peak, DFO denotes Deferoxamine) and pulcherrimin (PA-Fe(III); pink line). Source data are provided as a Source Data file.

When grown on MS medium, PA is produced by the WT at a high level only when Pf-5 is present. Also,  $\Delta yvmC$  but not WT cells showed high ROS levels in the presence of Pf-5. These results suggest that the presence of Pf-5 creates an oxidative environment that is mitigated by pulcherrimin. To confirm that PA prevents oxidative stress through Fe-sequestration, the resuspended biofilms were chemically supplemented with deferoxamine (DFO), a well-known ROS protective agent<sup>41</sup> and TPEN (N,N,N',N'-Tetrakis(2-pyridylmethyl)ethylenediamine), a metal chelators with high affinity for zinc<sup>42,43</sup>. Both DFO and TPEN supplementation in the  $\Delta yvmC$  mutant reduce extracellular ROS levels comparable to WT in both media (Figures 4.6a, b). However, TPEN did not reduce intracellular ROS at levels comparable to DFO supplementation (Supplementary Figures S4.8c, d) which implies that pulcherrimin, through Fe precipitation, mitigated oxidative stress in *B. subtilis*.

One distinctive trait of PA compared to most Fe-chelating agents is that after Fe binding, the resulting pulcherrimin complex precipitates. To explore the idea that Fe-sequestration by pulcherrimin immobilizes Fe(III) and prevents Fenton reactions, the

redox potential of Fe bound to PA was compared with two known metals chelators: EDTA and deferoxamine. The pre-formed complex Fe-EDTA showed reversible oxidation and reduction peaks centered at  $E = 83$  mV vs. Ag/AgCl (Figure 4.6c). The Fe-complexation by the strong chelator deferoxamine (pre-formed), in contrast, induced a large cathodic shift in the reduction potential to  $-750$  mV. This result demonstrates that reducing Fe bound to deferoxamine is more difficult (Figure 4.6c). For pulcherrimin compared to all ligands, no electrochemical reaction has been measured, which could either suggest: (1) that it binds to Fe(III) and precipitates which leads to a concentration below our detectable voltammetric levels; or (2) that Fe(III)-bound pulcherrimin possesses a reduction potential outside the window we scanned in (Figure 4.6c; Supplementary Figure S4.9). Nevertheless, both hypotheses lead to low Fe reduction in comparison to the other Fe(III)-chelators, demonstrating that pulcherrimin strongly counteract oxidative stress.

#### 4.2.5 Discussion

In natural environments, Fe acquisition is of central importance for microbes to compete and protect their ecological niches. Knowing the various strategies and molecules involved in Fe scavenging and sequestration is necessary to understand what drives bacterial interactions in natural communities. This study provides an unprecedented understanding of how pulcherrimin, a Fe-precipitating molecule from *B. subtilis* and other microorganisms, is involved in Fe acquisition and acts as a protective agent.

While PA production by *B. subtilis* and *Metschnikowia* was suggested to be either constitutive or modulated by abiotic factors<sup>14,44</sup>, we report here for the first time that it can be secreted in response to a specific competitor making PA part of *B. subtilis* competition toolbox. Signals triggering PA secretion are likely multifactorial since both diffusible molecules and volatiles produced by Pf-5 trigger a high proportion of PA-producing cells in the *B. subtilis* population (Figure 4.1). There is multiple

evidence that volatiles play an important role in modulating microbial communities<sup>45,46</sup>. Notably, *Pseudomonas* species' volatiles are diverse, and they can antagonize other microorganisms, including fungal and bacterial plant pathogens<sup>47,48,49</sup>. It could be interesting to examine how the production of pulcherrimin affects the fitness of *B. subtilis* in presence of other bacterial species and more importantly if pulcherrimin is produced during plant roots colonization.

The most striking trait of pulcherriminic acid is its precipitation upon Fe(III) binding<sup>15</sup>. While pulcherrimin has been proposed to act as a siderophore<sup>19</sup>, our work indicates that the PA-Fe complex is not readily available for uptake and is thus not a siderophore per se. However, our data also suggest that it could be involved in a larger strategy for Fe acquisition. One major limitation of siderophore-assisted acquisition is the high cost of siderophore production and Fe-siderophore complex retrieval. Furthermore, the loss of siderophores before recovery of Fe due to diffusion away from the cells and degradation (e.g., some siderophores are sensitive to oxidation) is likely to add to the cost of Fe uptake. PA synthesis is a two-step enzymatic reaction using Leucine-tRNA as precursor<sup>50</sup>, and BB is produced via a four-step non-ribosomal peptide synthesis<sup>12</sup>. Thus, the metabolic cost of PA is significantly lower than the one of BB. We propose that pulcherrimin could be part of a “store and mine” strategy. We can envision a model in which PA (low-metabolic cost) is secreted to rapidly immobilize environmental Fe within and in the proximity of the biofilm. This immobilized local source of Fe, unaffected by potential flows, could then be retrieved by BB (Figure 4.4) when Fe is needed.

The sequestration of valuable nutrients, intracellularly and extracellularly, is an effective strategy to manage competition<sup>51,52</sup>. Sequestering Fe(III) in a precipitate would be very effective in slowing Fe access to neighboring competitors lacking strong siderophores, providing a significant competitive edge to *B. subtilis*. But, as observed with Pf-5 (Figure 4.4d), it will not inhibit Fe acquisition by competitors owning high-affinity siderophores. In soils where multiple stressors (e.g., nutrients) constrain metabolic activity, immobilizing Fe still bear merits, if it results in an overall higher tax on Fe

acquisition by the competitor than *B. subtilis*. Thus, we argue that, while extracellular Fe sequestration by PA is most likely not a one fits all strategy to manage competitors, it is another valuable weapon in the arsenal at the disposal of *B. subtilis*, and potentially other species, to manage Fe when under competitive stress. Further research on PA-Fe use efficiency by *B. subtilis* and competitors is needed to further test this hypothesis. It is well established that in addition to Fe acquisition, siderophores have multiple physiological roles which result from their Fe chelation abilities<sup>53,54</sup>. In addition to its role as a Fe immobilizer, we observed that pulcherrimin could reduce oxidative stress levels in *B. subtilis* biofilm. Oxidative stress and Fe are interconnected via the Fenton reaction, in which Fe(II) is the substrate and Fe(III) is the product. Fe(III) binding by chelating agents, such as siderophores produced by various bacterial species, can impede its reduction to Fe(II) and thus prevent Fenton reaction<sup>53,55,56</sup>. By doing so, pulcherrimin would limit mortality rates due to ROS and allow sustained biofilm formation (Figure 4.2) since it was shown that *B. subtilis* needs to tightly control the level of ROS in order to fully develop its biofilm<sup>57</sup>. Using cyclic voltammetry, we confirmed that immobilization of Fe(III) by pulcherrimin prevents its reduction. Notably, the weak siderophore DHB, produced in high concentrations by *B. subtilis* against Pf-5, is a phenolic compound that can promote the Fenton reaction<sup>58,59</sup>. Hence, we propose that PA production and subsequent pulcherrimin complex formation counteract the effect of DHB (Figures 4.3c, d) and protect *B. subtilis* against oxidative stress during biofilm formation since it requires a large production of DHB<sup>22,24</sup> as well as accumulation of Fe for metabolic activities in the anoxic layers of the biofilm<sup>24</sup>.

Pulcherrimin and siderophore production are traits shared by many microbial species, and the Fe management strategies uncovered in this study may apply to more microbes other than *B. subtilis*. Indeed, PA has been confirmed, through comparative genome analysis, to be produced by isolates of *Bacillus cereus* (opportunistic pathogen) and *Staphylococcus epidermidis* (skin commensal bacterium)<sup>14</sup>. Forming an immobilized but accessible local source of Fe controlled by Fe-precipitating molecules and

siderophore production is an appealing strategy for biofilm (or colony) scale management of Fe and could be widespread in many ecosystems.

#### 4.2.6 Methods

##### 4.2.6.1 *Strains and culture conditions*

The strains and plasmids used in this study are listed in Table S4.1. *B. subtilis* strains were routinely cultivated in lysogenic broth (Luria-Bertani LB; 1% w/v tryptone, 0.5% w/v yeasts extract, 0.5% w/v NaCl) at 37 °C in agitation for 3 h. *Pseudomonas* strains were cultivated in LB at 30 °C in agitation for 3 h. When necessary, antibiotics were used at the following concentration: spectinomycin (100 µg·mL<sup>-1</sup>), kanamycin (10 µg·mL<sup>-1</sup>), ampicillin (100 µg·mL<sup>-1</sup>).

##### 4.2.6.2 *Strains construction*

All deletion mutants used in this study were purchased from the Bacillus Genetic Stock Center (BGSC) collection (<http://www.bgsc.org>) in the *B. subtilis* 168 background and were introduced in the undomesticated strains NCIB 3610 by transduction using SPP1-mediated generalized transduction<sup>60</sup>. For the P<sub>yvmC</sub>-yfp transcriptional reporters, the promoter region of yvmC was amplified by PCR from NCIB 3610 gDNA using primers PBB666 (5'-AGTCGAATTCTGTTTCATTAAGGTGCAGCAGTCTCAC-3') and PBB667 (5'-GTAGCATGCCTATTATGCCCGTCAAACGCAACG-3'). The PCR fragment was digested using the EcoRI and SphI restrictions enzymes and was ligated into the plasmid pKM003<sup>61</sup>. The resulting plasmid was linearized and transformed in *B. subtilis* 168 before being introduced into NCIB 3610 by transduction using SPP1 phages. For the P<sub>dhbA</sub>-lacZ transcriptional fusion, the promoter region of dhbA was amplified by PCR from NCIB 3610 gDNA using primers PBB696 (5'-

GCTAGAATTCGTATACGGGCAGAATTTTGCGAGT-3') and PBB697 (5'-GTACGGATCCTGCGCCTTGACTGGCAAGC-3'). Primers were ordered from Integrated DNA Technologies, IDT. The PCR fragment was digested using the EcoRI and BamHI restriction enzymes and ligated into the plasmid pDG1728<sup>62</sup>. The resulting plasmid was linearized and transformed in *B. subtilis* 168 before being introduced into NCIB 3610,  $\Delta yvmC$ , and  $\Delta pchR$  by transduction using SPP1 phages.

#### 4.2.6.3 *Pairwise interactions*

*B. subtilis* strains and *Pseudomonas* species were washed in PBS, and their OD<sub>600</sub> was adjusted at 0.6. Ten  $\mu$ L of cell suspension was then spotted at a 0.7 cm distance onto Murashige and Skoog (MS; Sigma – M5519; 20.61 mM NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub>, 100  $\mu$ M H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>, 2.99 mM CaCl<sub>2</sub>, 0.11  $\mu$ M CoCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O, 0.1  $\mu$ M CuSO<sub>4</sub>·5H<sub>2</sub>O, 100  $\mu$ M Na<sub>2</sub>-EDTA, 100  $\mu$ M FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 1.5 mM MgSO<sub>4</sub>, 100  $\mu$ M MnSO<sub>4</sub>·H<sub>2</sub>O, 1.03  $\mu$ M Na<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub>·2H<sub>2</sub>O, 5  $\mu$ M KI, 18.79 mM KNO<sub>3</sub>, 1.25 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 29.91  $\mu$ M ZnSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 26.64  $\mu$ M glycine, 0.56  $\mu$ M myo-inositol, 4.06  $\mu$ M nicotinic acid, 2.43  $\mu$ M pyridoxine·HCl, 0.30  $\mu$ M thiamine·HCl, 0.5% v/v glycerol, and 0.5% v/v glutamate) or MSgg (5 mM potassium phosphate and 100 mM MOPS (3-(*N*-morpholino) propanesulfonic acid) at pH 7.0 with 2 mM MgCl<sub>2</sub>, 700  $\mu$ M CaCl<sub>2</sub>, 50  $\mu$ M MnCl<sub>2</sub>, 50  $\mu$ M FeCl<sub>3</sub>, 1  $\mu$ M ZnCl<sub>2</sub>, 2  $\mu$ M thiamine, 0.5% v/v glycerol, and 0.5% v/v glutamate) supplemented with 1.5 % w/v agar, and incubated at 30 °C. When needed, X-Gal (5-Bromo-4-Chloro-3-Indolyl  $\beta$ -D-Galactopyranoside) was added at a final concentration of 120  $\mu$ g·mL<sup>-1</sup>. To assess biomass and CFUs, *B. subtilis* biofilms were removed using a sterile P200 tip and transferred into an Eppendorf tube containing 1 mL PBS. Biofilms were sonicated for 30 s to 60 s (until homogeneity) without pause at 30% amplitude. Cells were diluted and plated on LB for CFUs counting. Optical density at 600 nm (Biomass) was evaluated with a Genesys 30 S UV-Vis spectrophotometer.

#### 4.2.6.4 *Microscopy*

Two microscopes were used for this study. The stereo microscope Leica M165 FC was used to take brightfield images at different time points using the Leica MC170 HD camera. For fluorescence images, the Leica DFC3000 G (grayscale) camera was used. The Zeiss microscope Axio Zoom. V16 equipped with AxioCam 506 color camera was also used. Fiji (ImageJ1; version 2.9.0/ 1.53t) was used for image analysis.

#### 4.2.6.5 *Flow cytometry analysis*

For flow cytometry analysis of the *amyE::P<sub>yvmC</sub>-yfp* reporter, cells grown for 24 h were removed from the agar surface with a P200 tip and placed into an Eppendorf tube containing 1 mL of PBS. Cells were sonicated with an amplitude of 30% between 30 and 60 s without pause until homogeneity, then centrifuged at  $13,800 \times g$  for 2 min before adding 200  $\mu$ L of paraformaldehyde 4%. Cells were fixed for 7 min and washed twice with PBS before analysis. Data collection was performed with BD FACSJazz using a 488-nm laser and BD Accuri C6 plus. Data analysis was achieved with BD software (BD CSampler plus version 1.0.23.1 and BD FACS Software 1.2.0.142).

#### 4.2.6.6 *Iron quantification by ICP-MS*

Biofilms were weighed and then digested using 0.8 mL of nitric acid (trace metals grade; Fischer Scientific) on an SCP science Digiprep Jr at 65 °C for 45 min. After the digestion, 0.4 mL was transferred into a 15 mL falcon tube and filled with Milli-Q water to reach a final volume of 10 mL. For intracellular Fe quantification, cells were isolated from the matrix from an optimized protocol developed elsewhere<sup>22</sup>. Total biofilms were recovered in 1 mL of oxalate/EDTA (0.1 M/0.05 M) and incubated at room temperature (RT) for 7 min. Samples were centrifuged at  $6500 \times g$  for 7 min. The supernatant was discarded, and cells were resuspended in 1 mL NaCl 0.5 M before being sonicated for

30 s at 30% amplitude. NaOH was added to the supernatant at a final concentration of 0.1 M and incubated for 5 min at RT. Samples were centrifuged at  $6500 \times g$  for 7 min and resuspended again in 1 mL of oxalate/EDTA (0.1 M/0.05 M) for 7 min. Samples were centrifuged like the previous steps and pellets were resuspended in diluted oxalate/EDTA solution (0.025 M/0.0125 M) for 7 min. Finally, cells were centrifuged and stored at 4 °C until analysis. Cells were digested as described above. Samples were analyzed for Fe content on an ICP-MS XSeries 2; Thermo Scientific and on an ICP-MS Agilent 7850 equipped with an autosampler SPS 4.

#### 4.2.6.7 *Pulcherrimin purification and PA synthesis*

Purification of pulcherrimin was modified from previously described protocols<sup>15,19</sup>. Briefly, *B. subtilis* NCIB 3610 was grown at 37 °C for 3 h in LB with agitation to reach an  $OD_{600} = 1-1.5$ . One mL of *B. subtilis* NCIB 3610 ( $OD_{600}$  normalized at 1) was inoculated in 50 mL MSgg medium on a 200 mL culture flask without agitation at 37 °C for 48–72 h (until a clear red precipitate was visible). The culture was centrifuged at 4 °C for 15 min at  $27,000 \times g$ . The supernatant was discarded, and 25 mL of NaOH 2 M was added to solubilize the red precipitate. The yellow mixture was centrifuged at  $20,000 \times g$  at 4 °C to remove precipitated iron. The clear supernatant was transferred and acidified with 36.5–38% HCl to reach pH=1. After adding HCl, the mixture started to turn red and pulcherrimin precipitation started to appear. The mixture was incubated overnight at 4 °C. Then, the mixture was centrifuged at  $10,000 \times g$  and the precipitated pulcherrimin was washed with 100% EtOH. Pulcherrimin was dried at 37 °C overnight and stored at 4 °C until needed. Details on pulcherriminic acid synthesis are provided in the supplementary information.



#### 4.2.6.8 *β-galactosidase assays*

*B. subtilis* biofilms were suspended in Z-buffer (40 mM NaHPO<sub>4</sub>; 60 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>; 1 mM MgSO<sub>4</sub>; 10 mM KCl) before sonication at 30% amplitude for 30 s and OD<sub>600</sub> was measured. β-mercaptoethanol was added to a final concentration of 38 mM. Twenty microliter of lysozyme (20 mg/mL) was added to the bacterial suspension and incubated at 30 °C between 30 min and 1 h. All samples were diluted and 100 μL of an ONPG solution (4 mg/mL) in z-buffer with β-mercaptoethanol (38 mM) was added. When solutions started to turn yellow, 250 μL of 1 M Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> was added to stop the reaction and OD<sub>420</sub> and OD<sub>550</sub> was recorded. The miller units were calculated based on the following equation: (Équation 4.1) Miller Units = 1000 × [(A<sub>420nm</sub> - 1.75 × OD<sub>550nm</sub>)] / (T<sub>min</sub> × V<sub>mL</sub> × OD<sub>600</sub>).

#### 4.2.6.9 *Pellicle formation and growth curves with pulcherrimin*

*B. subtilis* cells were grown to exponential phase in LB at 37 °C for 3 h, washed, and resuspended in PBS at an OD<sub>600</sub> = 1. Then, 15 μL were inoculated in 1 mL of MSgg in a 24-well plate. Iron chloride (FeCl<sub>3</sub>) or pulcherrimin or Fe-citrate were added at 12 h post-inoculation at a final concentration of 50 μM. To evaluate growth, the content of the wells was harvested at 12 h, 18 h, 24 h, 30 h, and 36 h, sonicated to disrupt the pellicle and aggregates. The biomass was assessed by optical density at OD<sub>600</sub>, and cells were diluted and plated on LB agar plates to count CFUs.

#### 4.2.6.10 *In vitro dissociation kinetics assays using UPLC-MS/MS*

All chemicals used in this work were analytical grade. Methanol (MeOH), water (H<sub>2</sub>O), and formic acid (FA) (Optima grade for LC-MS) were purchased from Fisher Scientific (Ottawa, ON, Canada). Samples were centrifuged at 10,000 × g for 10 min at 4 °C. The supernatant was collected and cleaned by solid phase extraction (SPE) using HLB

cartridges (Waters Corporation, Milford, MA). Cartridges were conditioned with 1 mL of MeOH and equilibrated with 1 mL H<sub>2</sub>O. After loading 1 mL of supernatant, the SPE cartridge was rinsed with 1 mL H<sub>2</sub>O and dried for 1 min using a gentle nitrogen flow. The analyte was eluted using four times 250 µL of MeOH. Finally, the sample was filtered through a 0.22 µm PTFE syringe filter before UPLC-MS/MS analysis. Samples analyses were performed by liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometry (UPLC, Xevo TQ MS). Compounds were separated with an HSS-T3 (100 × 2.1 mm, particle size of 1.8 µm) (Waters Corporation, Milford, MA). The mobile phase consisted of solvent A (H<sub>2</sub>O + 0.1% FA) and of solvent B (MeOH + 0.1% FA). The flow rate was set to 0.4 mL/min, and the injected volume was 3 µL. After injection, the samples were eluted with the following gradient: 0–1 min, 5% B, 1–4 min, 5–100% B, 4–6 min, 100% B, 6–7 min, 100–5% B, 7–8 min, 5% B. The efficiency of the method is shown in table S4.2. for linearity. The recovery and detection, and quantification limits are presented in table S4.3. The limits of detection (LOD) and quantification (LOQ) were determined according to the International Committee on Harmonization as three and ten times the standard error of the calibration curve<sup>63</sup>.

#### 4.2.6.11 *Measurement of ROS levels*

*B. subtilis* colonies were harvested after 24 h and sonicated at 30% amplitude for 30–60 s until homogenous. The cells suspension was then mixed with 2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate (DCFH<sub>2</sub>-DA; purity ≥97%, Sigma), a fluorogenic dye that is converted to the fluorescent DCF, at a final concentration of 100 µM and incubated in the dark for 1 h. Deferoxamine mesylate (DFO; purity ≥92.5%, Sigma) and N,N,N',N'-Tetrakis(2-pyridylmethyl)ethylenediamine (TPEN; purity ≥97%, EMD Millipore). Cells were pellets by centrifugation at 16,200 × g for 1 min. The supernatant was collected (100 µL) and cells were resuspended in PBS before being transferred into a 96-well plate (100 µL), and the fluorescent intensity was measured

with a TECAN Spark monochromator-based (SparkControl version 3.1) with an excitation wavelength of 485 nm and emission wavelength of 535 nm, bandwidth 20.

#### 4.2.6.12 *Cyclic voltammetry*

To characterize the redox potential of pulcherrimin, cyclic voltammetry was performed to evaluate to what extent pulcherrimin immobilizes Fe(III) compared to known Fe chelators such as deferoxamine and EDTA. Fe-Deferoxamine et Fe-EDTA complexes were pre-formed for 1 h in the dark. For Fe-PA, the complexation was performed in the electrochemical cell 3 min prior to collecting the first voltammogram. The experiment was conducted on a CHI-1040C (CH Instruments). A 3 mm diameter glassy carbon working electrode (CHI104), a platinum plate (counter electrode), and an Ag/AgCl (KCl saturated; reference electrode) were used and acquired from CH Instruments. All voltammetric experiments were performed in deoxygenated PBS with a constant flow of argon by cycling the potential between  $-1.0$  and  $1.0$  V at a scan rate of  $25 \text{ mV}\cdot\text{s}^{-1}$ . All solutions were evaluated with  $10^{-4}$  M of Fe (ratio 1:1; Ligand-Metal) except for pulcherriminic acid, where  $2 \times 10^{-4}$  M was added (3:2 ratio; PA-Fe).

#### 4.2.6.13 *Statistical analysis*

Statistical analysis was performed with GraphPad Prism 9 version 9.4.0.

#### 4.2.7 Data Availability

Source data are provided with this paper.

#### 4.2.8 Acknowledgements

We thank members of Beauregard laboratory, Bellenger laboratory, and Matthew F. Traxler laboratory for helpful discussions. We also thank Daniel Garneau, Philippe Venne, René Gagnon, Matthieu Fillion, and Daniel Fortin for technical advice. We thank François M. M. Morel and Anne M. Kraepiel-Morel for critical reading of the manuscript. This work was supported by a master's degree Fellowship (302246) from Fond de Recherche—Nature et Technologies to F.O, by a Doctoral fellowship (299933) from Fond de Recherche—Nature et Technologies to V.C.L, by NSERC discovery grant RGPIN-2016-03660 to J.P.B and NSERC discovery grant RGPIN-2020-07057 to P.B.B.

#### 4.2.9 References

1. Jolivet, J.-P., Chanéac, C. & Tronc, E. Iron oxide chemistry. From molecular clusters to extended solid networks. *Chem. Commun.* 5, 477–483 (2004).
2. Skaar, E. P. The battle for iron between bacterial pathogens and their vertebrate hosts. *PLoS Pathog* 6, e1000949 (2010).
3. Andrews, S. C., Robinson, A. K. & Rodríguez-Quñones, F. Bacterial iron homeostasis. *FEMS Microbiol Rev.* 27, 215–237 (2003).
4. Chandrangsu, P., Rensing, C. & Helmann, J. D. Metal homeostasis and resistance in bacteria. *Nat. Rev. Microbiol* 15, 338–350 (2017).
5. Ratledge, C. & Dover, L. G. Iron metabolism in pathogenic bacteria. *Annu. Rev. Microbiol* 54, 881–941 (2000).
6. Niehus, R., Picot, A., Oliveira, N. M., Mitri, S. & Foster, K. R. The evolution of siderophore production as a competitive trait. *Evolution (N Y)* 71, 1443–1455 (2017).

7. Miethke, M., Kraushaar, T. & Marahiel, M. A. Uptake of xenosiderophores in *Bacillus subtilis* occurs with high affinity and enhances the folding stabilities of substrate binding proteins. *FEBS Lett.* 587, 206–213 (2013).
8. Hibbing, M. E., Fuqua, C., Parsek, M. R. & Peterson, S. B. Bacterial competition: surviving and thriving in the microbial jungle. *Nat. Rev. Microbiol* 8, 15–25 (2010).
9. Kramer, J., Özkaya, Ö. & Kümmerli, R. Bacterial siderophores in community and host interactions. *Nat. Rev. Microbiol* 18, 152–163 (2020).
10. Leinweber, A., Weigert, M. & Kümmerli, R. The bacterium *Pseudomonas aeruginosa* and gradually responds to interspecific competition for iron. *Evolution (N Y)* 72, 1515–1528 (2018).
11. Butaitė, E., Baumgartner, M., Wyder, S. & Kümmerli, R. Siderophore cheating and cheating resistance shape competition for iron in soil and freshwater *Pseudomonas* communities. *Nat. Commun* 8, 414 (2017).
12. May, J. J., Wendrich, T. M. & Marahiel, M. A. The *dhb* Operon of *Bacillus subtilis* encodes the biosynthetic template for the catecholic siderophore 2,3-dihydroxybenzoate-glycine-threonine trimeric ester bacillibactin. *J. Biol. Chem.* 276, 7209–7217 (2001).
13. Wang, D. et al. Regulation of the synthesis and secretion of the iron chelator cyclodipeptide pulcherriminic acid in *Bacillus licheniformis*. *Appl. Environ. Microbiol.* 84, e00262–18 (2018).
14. Arnaouteli, S. et al. Pulcherrimin formation controls growth arrest of the *Bacillus subtilis* biofilm. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 116, 13553–13562 (2019).
15. Kluyver, A. J., van der Walt, J. P. & van Triet, A. J. Pulcherrimin, the pigment of *Candida Pulcherrima*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 39, 583–593 (1953).
16. MacDonald, J. C. The structure of pulcherriminic acid. *Can. J. Chem.* 41, 165–172 (1963).
17. Melvydas, V., Staneviciene, R., Balynaite, A., Vaiciuniene, J. & Garjonyte, R. Formation of self-organized periodic patterns around yeasts secreting a precursor of a red pigment. *Microbiol Res.* 193, 87–93 (2016).
18. Rychel, K., Sastry, A. V. & Palsson, B. O. Machine learning uncovers independently regulated modules in the *Bacillus subtilis* transcriptome. *Nat. Commun.* 11, 6338 (2020).

19. Krause, D. J. et al. Functional and evolutionary characterization of a secondary metabolite gene cluster in budding yeasts. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 115, 11030–11035 (2018).
20. Oro, L., Ciani, M. & Comitini, F. Antimicrobial Activity of *Metschnikowia pulcherrima* on Wine Yeasts. *J. Appl. Microbiol.* 116, 1209–1217 (2014).
21. Mažeika, K. et al. Features of iron accumulation at high concentration in pulcherrimin-producing *Metschnikowia* yeast biomass. *JBIC J. Biol. Inorganic Chem.* 26, 299–311 (2021).
22. Rizzi, A., Roy, S., Bellenger, J.-P. & Beauregard, P. B. Iron homeostasis in *Bacillus subtilis* requires siderophore production and biofilm formation. *Appl. Environ. Microbiol.* 85, e02439–18 (2019).
23. Rizzi, A. et al. *Bacillus subtilis* modulates its usage of biofilm-bound iron in response to environmental iron availability. *Appl. Environ. Microbiol. AEM* 86, 00944–20 (2020).
24. Qin, Y. et al. Heterogeneity in respiratory electron transfer and adaptive iron utilization in a bacterial biofilm. *Nat. Commun* 10, 3702 (2019).
25. Marcus, M. & Marahiel, M. A. Siderophore-based iron acquisition and pathogen control. *Microbiol Mol. Biol. Rev.* 71, 413–451 (2007).
26. Molina-Santiago, C. et al. The extracellular matrix protects *Bacillus subtilis* colonies from pseudomonas invasion and modulates plant co-colonization. *Nat. Commun* 10, 1919 (2019).
27. Powers, M. J., Sanabria-Valentin, E., Bowers, A. A. & Shank, E. A. Inhibition of cell differentiation in *Bacillus subtilis* by *Pseudomonas protegens*. *J. Bacteriol* 197, 2129–2138 (2015).
28. Howell, C. R. & Stipanovic, R. D. Control of *Rhizoctonia solani* on cotton seedlings with *Pseudomonas fluorescens* and with an antibiotic produced by the bacterium. *Phytopathology* 69, 480–482 (1979).
29. Geels, F. P. & Schippers, B. Reduction of yield depressions in high frequency potato cropping soil after seed tuber treatments with antagonistic fluorescent *Pseudomonas* spp. *J. Phytopathol.* 108, 207–214 (1983).

30. Berendsen, R. L. et al. Unearthing the genomes of plant-beneficial *Pseudomonas* model strains WCS358, WCS374 and WCS417. *BMC Genomics* 16, 539 (2015).
31. Zhexian, L. et al. A genome-wide screen identifies genes in Rhizosphere-associated *Pseudomonas* required to evade plant defenses. *mBio* 9, e00433–18 (2022).
32. Loper, J. E., Kobayashi, D. Y. & Paulsen, I. T. The genomic sequence of *Pseudomonas fluorescens* Pf-5: Insights into biological control. *Phytopathology* 97, 233–238 (2007).
33. Liu, J. et al. Metabolic co-dependence gives rise to collective oscillations within biofilms. *Nature* 523, 550–554 (2015).
34. Bonnefond, L. et al. Structural basis for nonribosomal peptide synthesis by an aminoacyl-tRNA synthetase paralog. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 108, 3912 LP–3913917 (2011).
35. Yan, Q. et al. Secondary metabolism and interspecific competition affect accumulation of spontaneous mutants in the GacS-GacA regulatory system in *Pseudomonas protegens*. *mBio* 9, e01845–17 (2018).
36. Kidarsa, T. A., Goebel, N. C., Zabriskie, T. M. & Loper, J. E. Phloroglucinol mediates cross-talk between the pyoluteorin and 2,4-diacetylphloroglucinol biosynthetic pathways in *Pseudomonas fluorescens* Pf-5. *Mol. Microbiol* 81, 395–414 (2011).
37. Kolodkin-Gal, I. et al. Respiration control of multicellularity in *Bacillus subtilis* by a complex of the cytochrome chain with a membrane-embedded histidine kinase. *Genes Dev.* 27, 887–899 (2013).
38. Galaris, D., Barbouti, A. & Pantopoulos, K. Iron homeostasis and oxidative stress: An intimate relationship. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Mol. Cell Res.* 1866, 118535 (2019).
39. Reiniers, M. J. et al. Preparation and Practical Applications of 2',7'-Dichlorodihydrofluorescein in Redox Assays. *Anal. Chem.* 89, 3853–3857 (2017).
40. Murphy, M. P. et al. Guidelines for measuring reactive oxygen species and oxidative damage in cells and in vivo. *Nat. Metab.* 4, 651–662 (2022).

41. LeBel, C. P., Ischiropoulos, H. & Bondy, S. C. Evaluation of the probe 2',7'-dichlorofluorescein as an indicator of reactive oxygen species formation and oxidative stress. *Chem. Res. Toxicol.* 5, 227–231 (1992).
42. Cho, Y.-E. et al. Cellular Zn depletion by metal ion chelators (TPEN, DTPA and chelex resin) and its application to osteoblastic MC3T3-E1 cells. *Nutr. Res. Pract.* 1, 29–35 (2007).
43. Blindauer, C. A., Razi, M. T., Parsons, S. & Sadler, P. J. Metal complexes of N,N,N',N'-tetrakis(2-pyridylmethyl)ethylenediamine (TPEN): Variable coordination numbers and geometries. *Polyhedron* 25, 513–520 (2006).
44. Horváth, E. et al. The antagonistic *Metschnikowia andauensis* produces extracellular enzymes and pulcherrimin, whose production can be promoted by the culture factors. *Sci. Rep.* 11, 10593 (2021).
45. Kim, K., Lee, S. & Ryu, C.-M. Interspecific bacterial sensing through airborne signals modulates locomotion and drug resistance. *Nat. Commun* 4, 1809 (2013).
46. Weisskopf, L., Schulz, S. & Garbeva, P. Microbial volatile organic compounds in intra-kingdom and inter-kingdom interactions. *Nat. Rev. Microbiol.* 19, 391–404 (2021).
47. Raza, W. et al. Volatile organic compounds produced by *Pseudomonas fluorescens* WR-1 restrict the growth and virulence traits of *Ralstonia solanacearum*. *Microbiol Res.* 192, 103–113 (2016).
48. Prigigallo, M. I. et al. Basidiomycetes are particularly sensitive to bacterial volatile compounds: mechanistic insight into the case study of *Pseudomonas protegens* Volatilome Against *Heterobasidion abietinum*. *Front Microbiol* 12, 684664 (2021).
49. Ossowicki, A., Jafra, S. & Garbeva, P. The antimicrobial volatile power of the rhizospheric isolate *Pseudomonas donghuensis* P482. *PLoS One* 12, e0174362 (2017).
50. Randazzo, P., Aubert-Frambourg, A., Guillot, A. & Auger, S. The MarR-like protein PchR (YvmB) regulates expression of genes involved in pulcherriminic acid biosynthesis and in the initiation of sporulation in *Bacillus subtilis*. *BMC Microbiol* 16, 190 (2016).
51. de Mazancourt, C. & Schwartz, M. W. Starve a competitor: evolution of luxury consumption as a competitive strategy. *Theor. Ecol.* 5, 37–49 (2012).



52. Hood, M. I. & Skaar, E. P. Nutritional immunity: transition metals at the pathogen–host interface. *Nat. Rev. Microbiol* 10, 525–537 (2012).
53. Peralta, D. R. et al. Enterobactin as part of the oxidative stress response repertoire. *PLoS One* 11, e0157799 (2016).
54. Adler, C. et al. Catecholate siderophores protect bacteria from pyochelin toxicity. *PLoS One* 7, e46754 (2012).
55. Touati, D. Iron and oxidative stress in bacteria. *Arch Biochem. Biophys.* 373, 1–6 (2000).
56. Cornish, A. S. & Page, W. J. The catecholate siderophores of *Azotobacter vinelandii*: Their affinity for iron and role in oxygen stress management. *Microbiology (N Y)* 144, 1747–1754 (1998).
57. Gozzi, K. et al. *Bacillus subtilis* utilizes the DNA damage response to manage multicellular development. *NPJ Biofilms Microbiomes* 3, 8 (2017).
58. Xu, J. & Jordan, R. B. Kinetics and mechanism of the oxidation of 2,3-dihydroxybenzoic acid by iron(III). *Inorg. Chem.* 27, 4563–4566 (1988).
59. Lorigooini, Z., Jamshidi-kia, F. & Hosseini, Z. Chapter 4 - Analysis of aromatic acids (phenolic acids and hydroxycinnamic acids). in *Recent Advances in Natural Products Analysis* (eds. Sanches Silva, A., Nabavi, S. F., Saeedi, M. & Nabavi, S. M.) 199–219 (Elsevier, 2020).
60. Yasbin, R. E. & Young, F. E. Transduction in *Bacillus subtilis* by Bacteriophage SPP1. *J. Virol* 14, 1343–1348 (1974).
61. Sullivan, N. L., Marquis, K. A. & Rudner, D. Z. Recruitment of SMC by ParB-parS organizes the origin region and promotes efficient chromosome segregation. *Cell* 137, 697–707 (2009).
62. Guérout-Fleury, A.-M., Frandsen, N. & Stragier, P. Plasmids for ectopic integration in *Bacillus subtilis*. *Gene* 180, 57–61 (1996).
63. ICH Q2(R1) guidelines. *Validation of analytical procedures: text and methodology Q2* (2005).

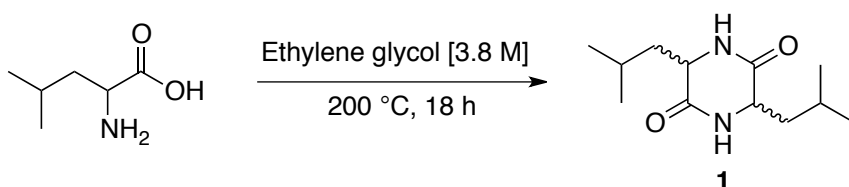
#### 4.2.10 Supplementary data

##### **Pulcherrimic acid synthesis – General details**

All non-aqueous reactions involving air or moisture sensitive compounds were run under an inert atmosphere (nitrogen or argon) with rigid exclusion of moisture from reagents and glassware using standard techniques. All glassware was stored in the oven and/or was flame dried prior to use under an inert atmosphere of gas. The solvents and chemicals used for the procedure were acquired either at Sigma-Aldrich or Fisher Canada (distributing Acros, TCI, and Alfa Aesar chemicals in Canada). Anhydrous solvents were obtained either by distillation over sodium (THF, ether), over calcium hydride ( $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ ). Analytical thin-layer chromatography (TLC) was performed on precoated, glass-backed silica gel (Merck 60 F<sub>254</sub>). Visualization of the developed chromatogram was performed by UV absorbance, aqueous cerium molybdate, ethanolic phosphomolybdic acid, iodine, or aqueous potassium permanganate. Flash column chromatography was performed using 230-400 mesh silica (EM Science or Silicycle) of the indicated solvent system according to standard technique. Chemical purity was assessed by analysis of  $^1\text{H}$  and  $^{13}\text{C}$  NMR spectra. Infrared spectra were taken on a Perkin Elmer Spectrum One FTIR and are reported in reciprocal centimeters ( $\text{cm}^{-1}$ ). Nuclear magnetic resonance spectra ( $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ , DEPT, COSY, HMQC) were recorded either on a Bruker Avance III HD 300 or Varian Mercury+ 400 spectrometer. Chemical shifts for  $^1\text{H}$  NMR spectra are recorded in parts per million from tetramethylsilane with the solvent resonance as the internal standard. Data are reported as follows: chemical shift, multiplicity (s = singlet, d = doublet, t = triplet, q = quartet, qn = quintet, sext = sextuplet, non = nonet, m = multiplet and br = broad), coupling constant in Hz, integration. Chemical shifts for  $^{13}\text{C}$  NMR spectra are recorded in parts per million from tetramethylsilane with the solvent resonance as the internal standard. When ambiguous, proton and carbon assignments were established using COSY, NOESY, HMQC and DEPT experiments. High resolution mass spectra were

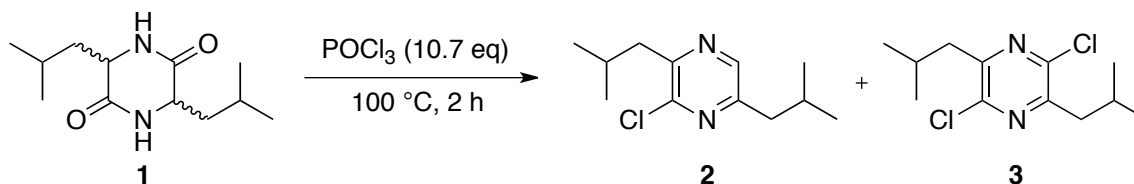
performed at Université de Sherbrooke. Melting points were obtained on a Buchi melting point apparatus and are uncorrected.

### 3,6-diisobutylpiperazine-2,5-dione (**1**)



*Method based on a modified procedure*<sup>1</sup>. In a sealed tube, flame dried and under argon, (L)-leucine (3.28 g, 25 mmol) was put in suspension in Ethylene Glycol (6.58 ml, [3.8 M]). The white bread-like mixture was heated at 200°C for 18 hours and became a brown/copper colored solution with agitation. After cooling to room temperature, the orange solid was washed with EtOAc (75 ml) then *i*-PrOH (10 ml), then dried *in-vacuo* to obtain an inconsequential mixture of isomers of 3,6-diisobutylpiperazine-2,5-dione (**1**) (1.72 g, 61 %) as a white solid, which could be used directly for the next step. **<sup>1</sup>H NMR** (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm) 6.17–6.11 (m, 2H), 4.02–3.94 (m, 2H), 1.93–1.73 (m, 4H), 1.70–1.58 (m, 2H), 1.02–0.94 (m, 12H). **<sup>13</sup>C NMR** (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm) 168.98, 168.85, 53.47, 53.30, 43.46, 42.23, 24.45, 24.37, 23.40, 23.31, 21.40, 21.25. NMR analysis is consistent with the known compound<sup>2</sup>.

### 3-chloro-2,5-diisobutylpyrazine (**2**) and 2,5-dichloro-3,6-diisobutylpyrazine (**3**)



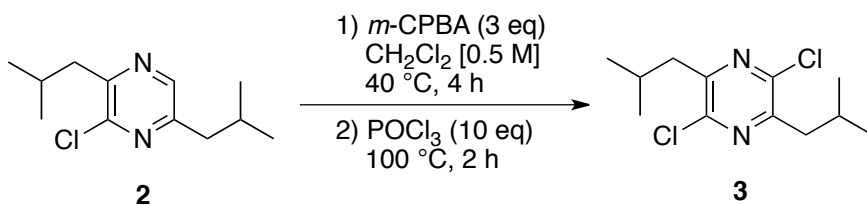
*Procedure for chlorination, based on a modified procedure*<sup>1</sup>. In a sealed tube, flame dried and under argon, 3,6-diisobutylpiperazine-2,5-dione (**1**) (905 mg, 4 mmol) was solubilized in Phosphorus(V) Oxychloride (4 ml, 42.8 mmol), then heated at 100°C and stirred for 2 hours. After the indicated time, the red mixture was cooled to room temperature, then poured slowly in stirred ice-cooled water (50 ml). After addition and

15 min of stirring, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (25 ml) was added, then the organic layer was extracted twice and washed with NaHCO<sub>3</sub> (sat.) (2x 25 ml). The organic layer was dried with MgSO<sub>4</sub>, filtered and concentrated. The products were separated by flash chromatography on silica, using a gradient from 1% to 2% Et<sub>2</sub>O / hexanes.

**3-chloro-2,5-diisobutylpyrazine (2)**, pale yellow oil (542 mg, 60 %): <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, Chloroform-*d*) δ (ppm) 8.23 (s, 1H), 2.80 (d, *J* = 7.2 Hz, 2H), 2.61 (d, *J* = 7.2 Hz, 2H), 2.21 (non, *J* = 6.8 Hz, 1H), 2.10 (non, *J* = 6.8 Hz, 1H), 0.96 (d, *J* = 6.7 Hz, 6H), 0.93 (d, *J* = 6.7 Hz, 6H); <sup>13</sup>C NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm) 154.22, 152.52, 148.26, 141.88, 43.60, 43.26, 28.95, 28.05, 22.51, 22.36; *R<sub>f</sub>* (1% Et<sub>2</sub>O / hexanes) : 0.05. NMR analysis is consistent with the known compound<sup>3</sup>.

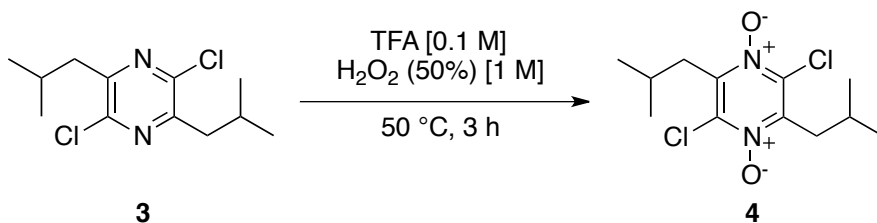
**2,5-dichloro-3,6-diisobutylpyrazine (3)**, clear oil (150 mg, 14 %): <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, Chloroform-*d*) δ (ppm) 2.76 (d, *J* = 7.2 Hz, 4H), 2.21 (non, *J* = 6.8 Hz, 2H), 0.96 (d, *J* = 6.7 Hz, 12H); <sup>13</sup>C NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm) 152.69, 145.99, 42.82, 28.24, 22.51; IR (Neat) ν (cm<sup>-1</sup>) 2950, 2925, 2875, 1475, 1400, 1325, 1100; *R<sub>f</sub>* (1% Et<sub>2</sub>O / hexanes) : 0.30; HRMS (ESI+) (m/z) calcd for C<sub>12</sub>H<sub>18</sub>Cl<sub>2</sub>N<sub>2</sub> [M+Na]<sup>+</sup>: 283.0739, found : 283.0745.

### 2,5-dichloro-3,6-diisobutylpyrazine (3)



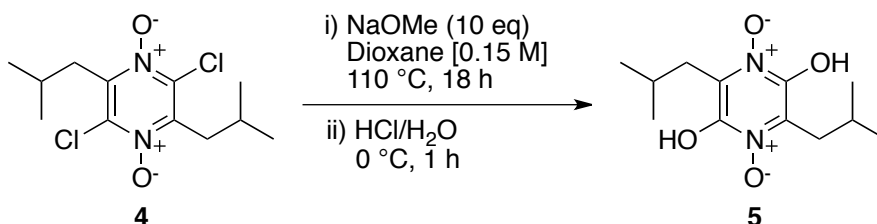
*Method based on a modified procedure*<sup>1</sup>. In a vial, 3-chloro-2,5-diisobutylpyrazine (**2**) (188 mg, 829 μmol) was solubilised in CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (1.66 ml, [0.5M]), then *m*-CPBA (429 mg, 2.49 mmol) was added. The mixture was heated at 40 °C and stirred for 4 hours. After the indicated time and cooling to room temperature, EtOAc (20 ml) was added, and the organic layer was washed with Na<sub>2</sub>SO<sub>3</sub> (10 % in water, 3x 20ml), then NaHCO<sub>3</sub> (sat. 3x 20ml). The organic layer was dried with MgSO<sub>4</sub>, filtered and concentrated *in-vacuo*. Without purification, the procedure for chlorination was performed to obtain 2,5-dichloro-3,6-diisobutylpyrazine (**3**) (84.6 mg, 39 %)

### 2,5-dichloro-3,6-diisobutylpyrazine 1,4-dioxide (4)



In a round bottom flask, 2,5-dichloro-3,6-diisobutylpyrazine (**3**) (360 mg, 1.38 mmol) was solubilized in THF (13.8 ml, [0.1 M]). The solution was cooled to 0°C, then H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (50% in water, 1.38 ml, [1M]) was added dropwise. After addition, the mixture was heated at 50°C and stirred for 3 hours. After cooling to room temperature, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (10 ml) was added, then the mixture was poured slowly in saturated Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> with ice (c.a. 30 ml). Na<sub>2</sub>SO<sub>3</sub> (10 % in water, 20 ml) was added, and the mixture was stirred 15 min at room temperature. The organic layer was extracted using CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (2x 25 ml), then dried over MgSO<sub>4</sub>, filtered and concentrated. The product was purified using flash chromatography on silica, with 1% MeOH in CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> as the eluant. 2,5-dichloro-3,6-diisobutylpyrazine 1,4-dioxide (**4**) was obtained as a yellow solid (260 mg, 64 %). **mp** 191°C; **<sup>1</sup>H NMR** (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm) 3.03 (d, *J* = 7.3 Hz, 4H), 2.34 (non, *J* = 6.8 Hz, 2H), 1.02 (d, *J* = 6.7 Hz, 12H); **<sup>13</sup>C NMR** (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm) 146.22, 139.81, 37.97, 26.35, 22.72; **IR** (Neat)  $\nu$  (cm<sup>-1</sup>) 2950, 2925, 2850, 1475, 1300, 1225, 1125, 1000; **R<sub>f</sub>** (1% MeOH / DCM) 0.45; **HRMS (ESI+)** (m/z) calcd for C<sub>12</sub>H<sub>18</sub>Cl<sub>2</sub>N<sub>2</sub>O<sub>2</sub> [M+Na]<sup>+</sup>: 315.0638, found : 315.0645.

### 2,5-dihydroxy-3,6-diisobutylpyrazine 1,4-dioxide (Pulcherrimic acid) (5)



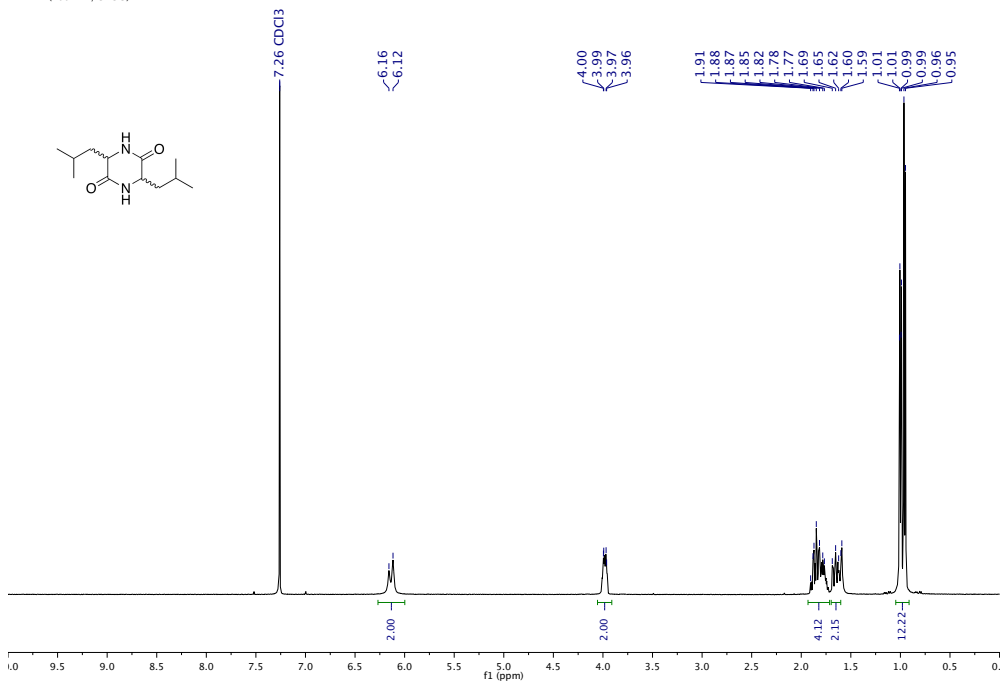
In a sealed tube, flame dried and under argon, sodium methoxide (326  $\mu$ L, 4.88 mmol) was weighted (in a glove box) then, under argon flow, 2,5-dichloro-3,6-

diisobutylpyrazine 1,4-dioxide (**4**) (143 mg, 488  $\mu\text{mol}$ ) was added. Finally dry 1,4-dioxane (3.26 ml, [0.15M]) was added to the solid mixture. The mixture was heated at 110°C and stirred for 18 hours. After cooling, the solvent was evaporated, and the product was dissolved in water (20 ml). The aqueous layer was washed with ether (2x 20ml), then the organic layer was removed. The aqueous layer was cooled to 0°C, then brought to pH 1 with concentrated HCl. The mixture was allowed to return to room temperature while stirring for 1h, then cooled back to 0 °C before filtration. The product is purified by trituration with pentane and Et<sub>2</sub>O to give pulcherriminic acid (**5**) (49.9 mg, 40%) as a white solid. **<sup>1</sup>H NMR** (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>)  $\delta$  (ppm) 2.68 (d, *J* = 7.3 Hz, 4H), 2.17-2.06 (m, 2H), 0.89 (d, *J* = 6.7 Hz, 12H). **<sup>13</sup>C NMR** (100 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>)  $\delta$  (ppm) 145.50, 129.61, 33.39, 26.20, 22.37; **IR** (Neat)  $\nu$  (cm<sup>-1</sup>) 3250-2000(br) 2957, 2868, 1654, 1578, 1511, 1466, 1394, 1220, 1153, 1067, 998, 967; **HRMS (ESI-)** (m/z) calcd for C<sub>12</sub>H<sub>19</sub>N<sub>2</sub>O<sub>4</sub> [M-H]<sup>-</sup>: 255.1350, found : 255.1352.

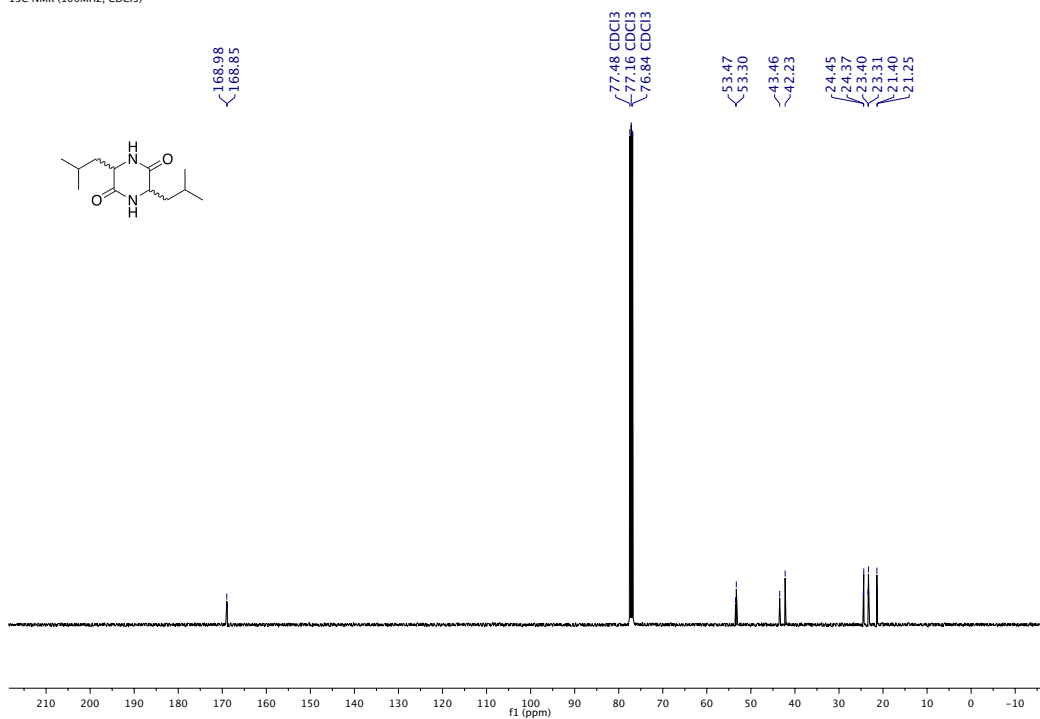
# 3,6-diisobutylpiperazine-2,5-dione

(1)

<sup>1</sup>H NMR (400MHz, CDCl<sub>3</sub>)



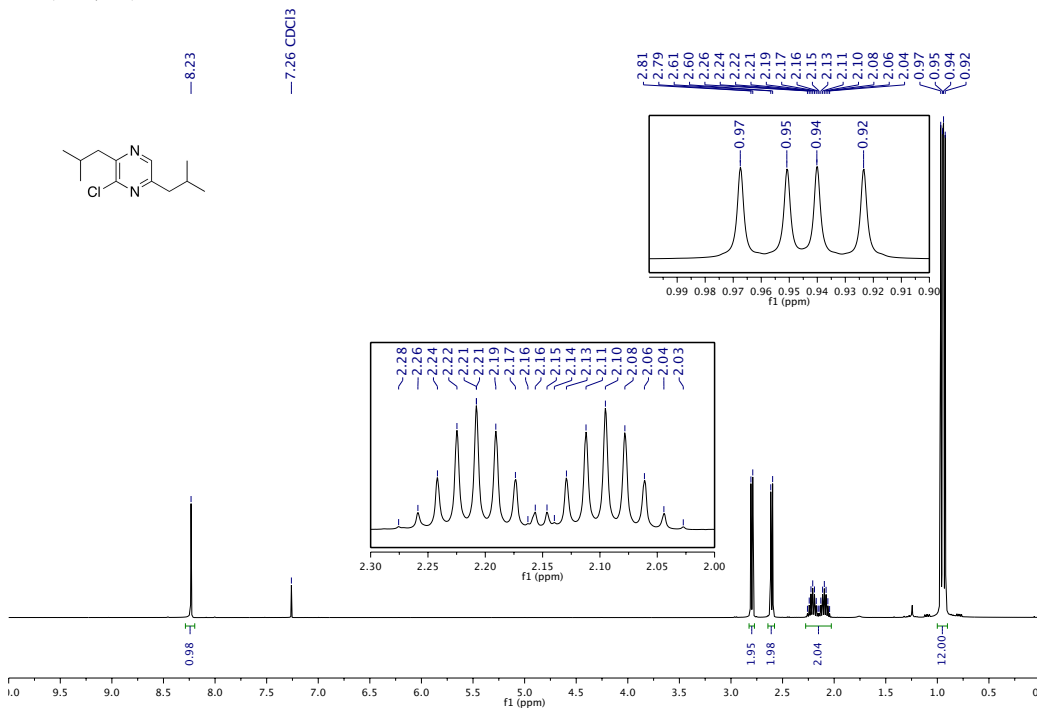
<sup>13</sup>C NMR (100MHz, CDCl<sub>3</sub>)



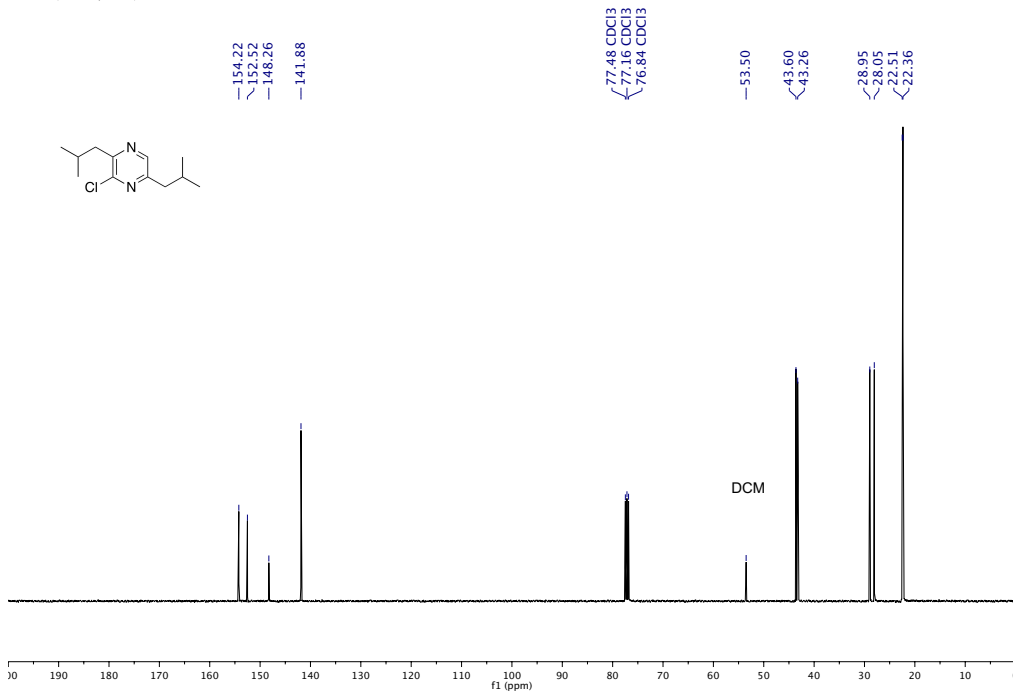
# 3-chloro-2,5-diisobutylpyrazine

(2)

<sup>1</sup>H NMR (400MHz, CDCl<sub>3</sub>)



<sup>13</sup>C NMR (100MHz, CDCl<sub>3</sub>)

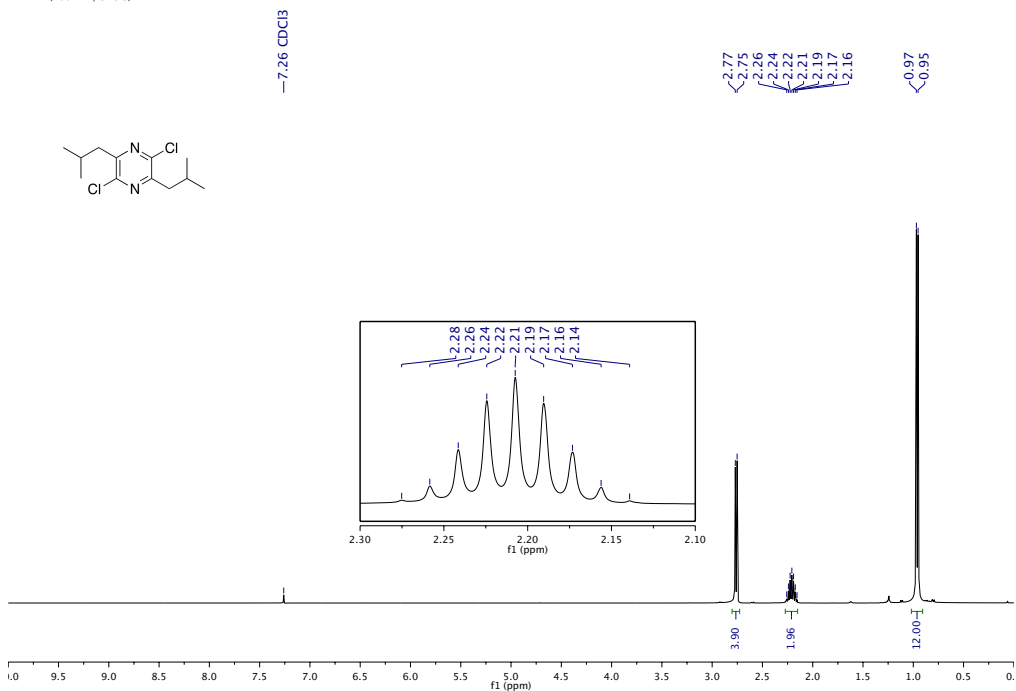




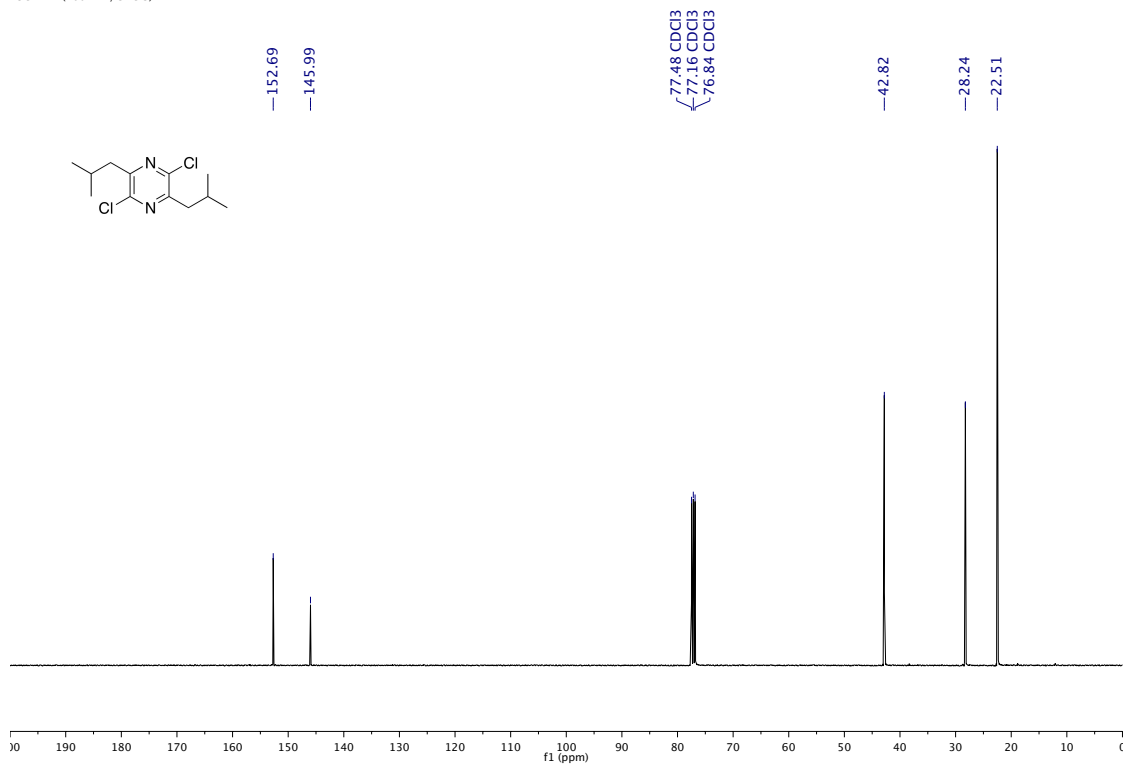
# 2,5-dichloro-3,6-diisobutylpyrazine

(3)

<sup>1</sup>H NMR (400MHz, CDCl<sub>3</sub>)

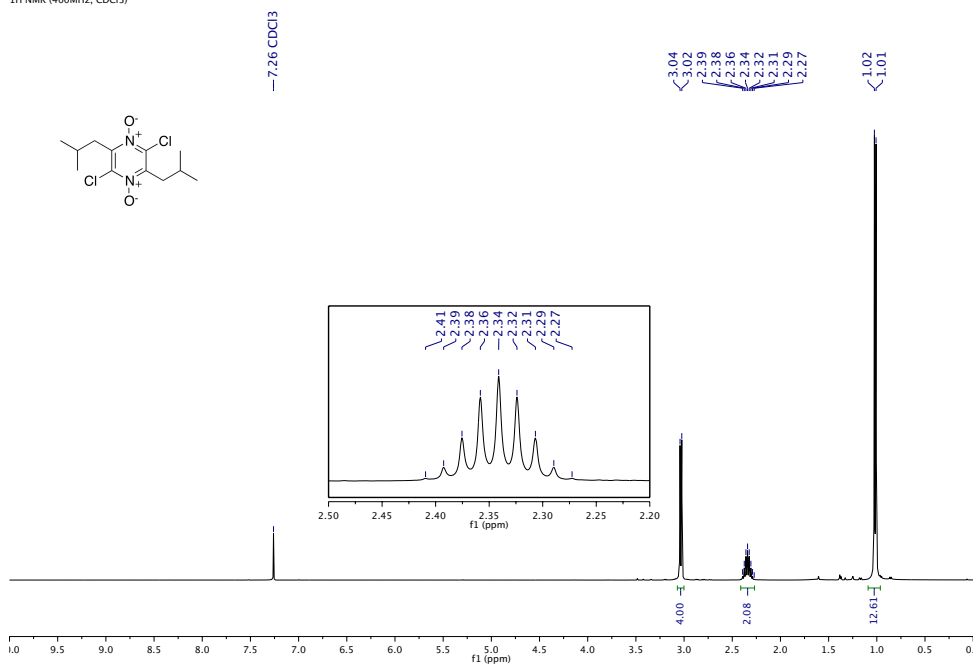


<sup>13</sup>C NMR (100MHz, CDCl<sub>3</sub>)

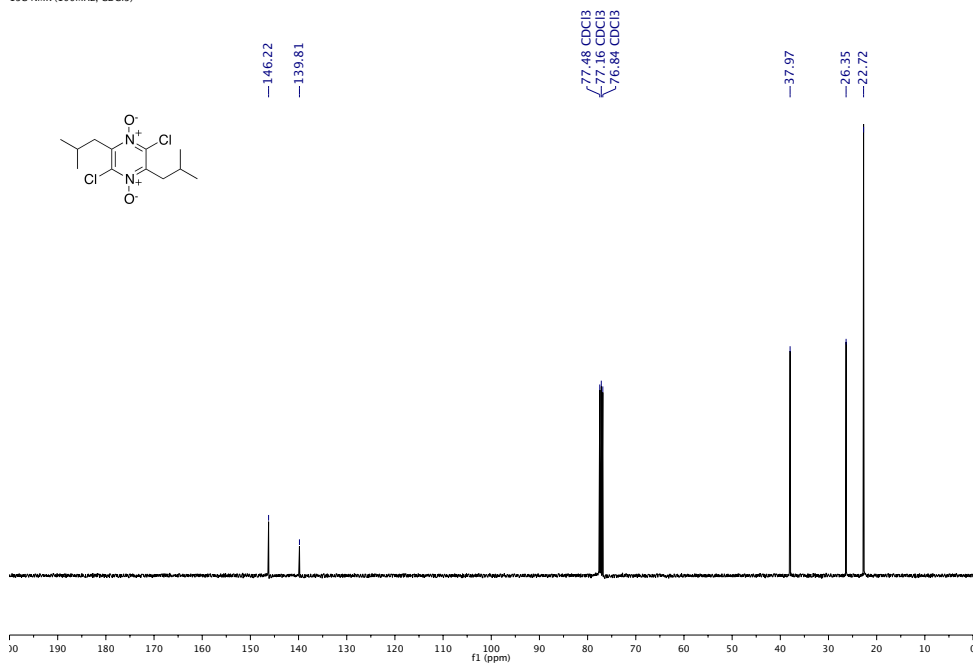


## 2,5-dichloro-3,6-diisobutylpyrazine 1,4-dioxide (4)

<sup>1</sup>H NMR (400MHz, CDCl<sub>3</sub>)

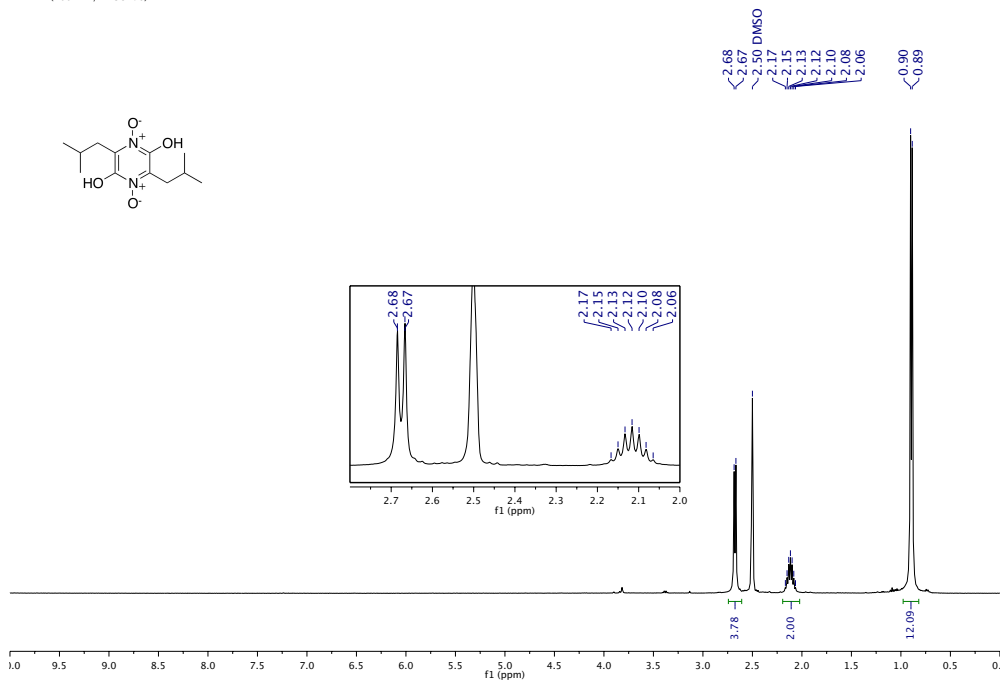


<sup>13</sup>C NMR (100MHz, CDCl<sub>3</sub>)

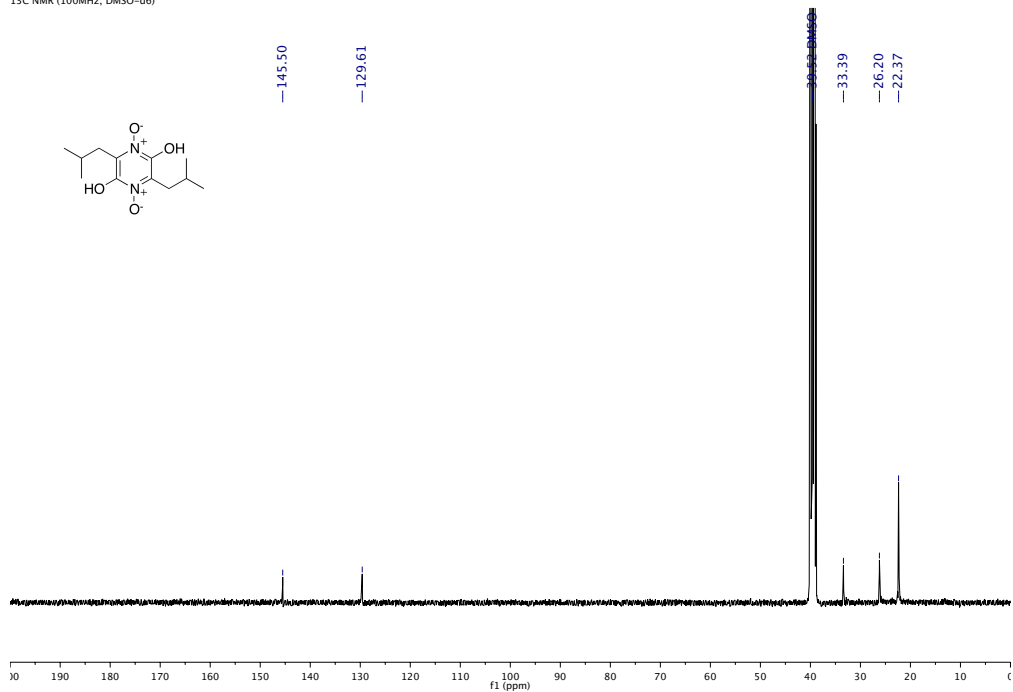


# 2,5-dihydroxy-3,6-diisobutylpyrazine 1,4-dioxide (pulcherriminic acid) (5)

<sup>1</sup>H NMR (400MHz, DMSO-d6)



<sup>13</sup>C NMR (100MHz, DMSO-d6)



**Table S4.1: Strains used in this study.**

<b>Strain</b>	<b>Genotype</b>	<b>Reference</b>
NCIB 3610	WT / undomesticated	Lab stock
168	Domesticated	Lab stock
<i>Escherichia coli</i> NEB5 $\alpha$	For molecular cloning	Lab stock
BKK35070	168 <i>yvmC::kan</i>	BGSC <sup>4</sup>
VCL97	3610 <i>yvmC::kan</i>	This study
BKK35080	168 <i>pchR::kan</i>	BGSC <sup>4</sup>
PB755	3610 <i>pchR::kan</i>	Lab stock
BKK31960	168 <i>dhbF::kan</i>	BGSC <sup>4</sup>
VCL109	3610 <i>dhbF::kan</i>	This study
VCL100	3610 <i>amyE::P<sub>yvmC</sub>-yfp</i>	This study
PB503	3610 <i>dhbA-F::erm</i>	Lab stock
VCL111	3610 <i>amyE::P<sub>dhbA</sub>-lacZ</i>	This study
VCL112	3610 <i>yvmC::kan amyE::P<sub>dhbA</sub>-lacZ</i>	This study
VCL113	3610 <i>pchR::kan amyE::P<sub>dhbA</sub>-lacZ</i>	This study
VCL118	3610 <i>yvmC::kan amyE::P<sub>yvmC</sub>-yvmC-cypX</i>	This study
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	WCS365	Lab stock
<i>Pseudomonas capeferrum</i>	WCS358	Lab stock
<i>Pseudomonas protegens</i>	Pf-5	Lab stock
<i>Pseudomonas protegens</i>	<i>phlD::tet</i>	Lab stock

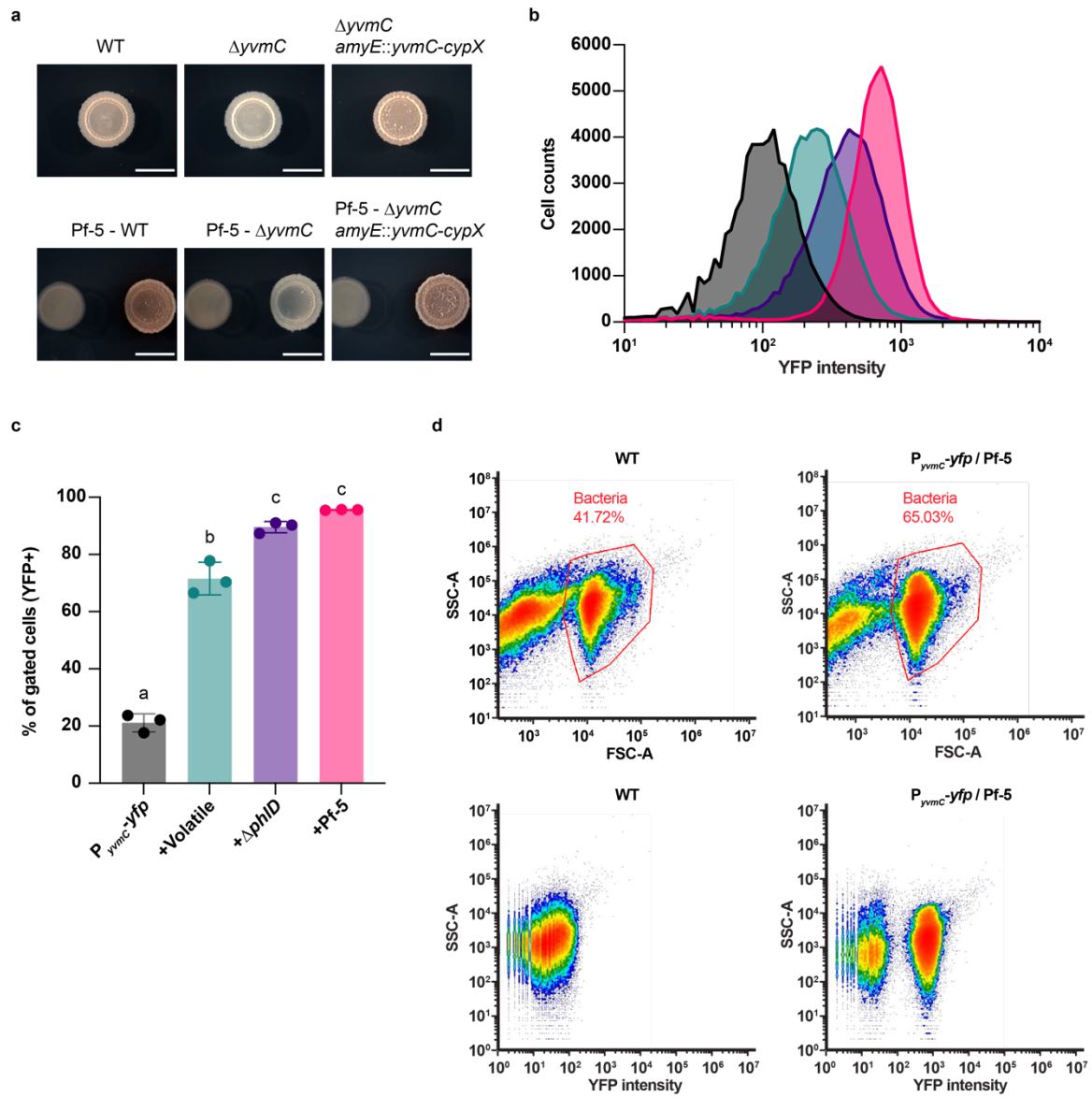
Antibiotics abbreviations: Kanamycin (kan), tetracycline (tet), erythromycin (erm)

**Table S4.2: Regression parameters**

<b>Analytes</b>	<b>Concentration (ng/mL)</b>	<b>Linear equation Y=a X+b</b>	<b>R<sup>2</sup></b>
<b>Bacillibactin (BB)</b>	0.01-2.5	Y= 10410 X – 1104	0.985
<b>Pulcherriminic acid (PA)</b>	0.1-10	Y= 595.77 X + 282.4	0.995

**Table S4.3: Limit of quantification**

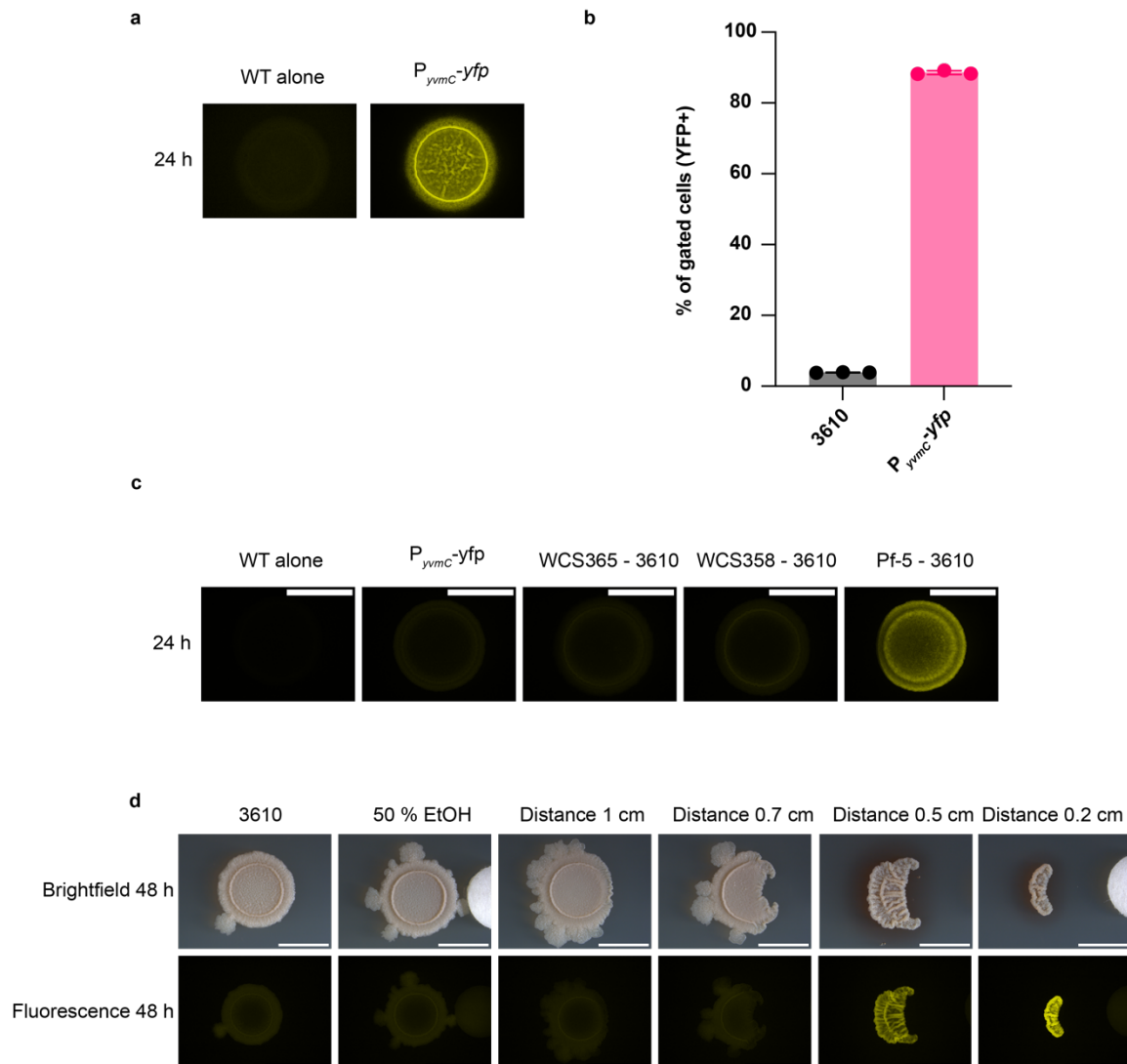
<b>Analytes</b>	<b>Recovery (%)</b>	<b>RSD (%)</b>	<b>LOD (ng/mL)</b>	<b>LOQ (ng/mL)</b>
Bacillibactin (BB)	72.1	7.01	0.017	0.029
Pulcherriminic acid (PA)	83.9	8.59	0.145	0.211



**Figure S4.1. *P. protegens* Pf-5 triggers the production of a red pigment in *B. subtilis* which is pulcherriminic acid.**

**a**, Representative images of biofilms from *B. subtilis* WT,  $\Delta yvmC$  and  $\Delta yvmC$  *amyE::P<sub>yvmC</sub>-yvmC-cypX*, in presence and absence of Pf-5 on MS medium after 48 h of growth. **b**, Flow cytometry analysis showing the distribution of fluorescence intensity of YFP-based transcriptional reporter for *yvmC* alone (black), volatile (teal),  $\Delta phlD$  mutant (purple), and Pf-5

(pink). **c**, Histograms showing the mean of cells fluorescent intensity in *B. subtilis* alone (black), volatiles (teal),  $\Delta phlD$  mutant (purple), and with Pf-5 (pink). **d**, Gating strategy used for flow cytometry. *B. subtilis* WT (negative control) and 3610  $P_{yvmC}$ -*yfp* next to Pf-5 (positive control) identify the bacterial population compared to PBS that is always examined before the runs. Data are presented as mean values  $\pm$  SD,  $n=3$ . All experiments were performed in three biological replicates with three technical replicates. Representative experiments and pictures are presented. Different letters indicate statistically significant differences,  $P < 0.05$ , one-way ANOVA and Tukey's multiple comparisons test). Source data are provided as a Source Data file.

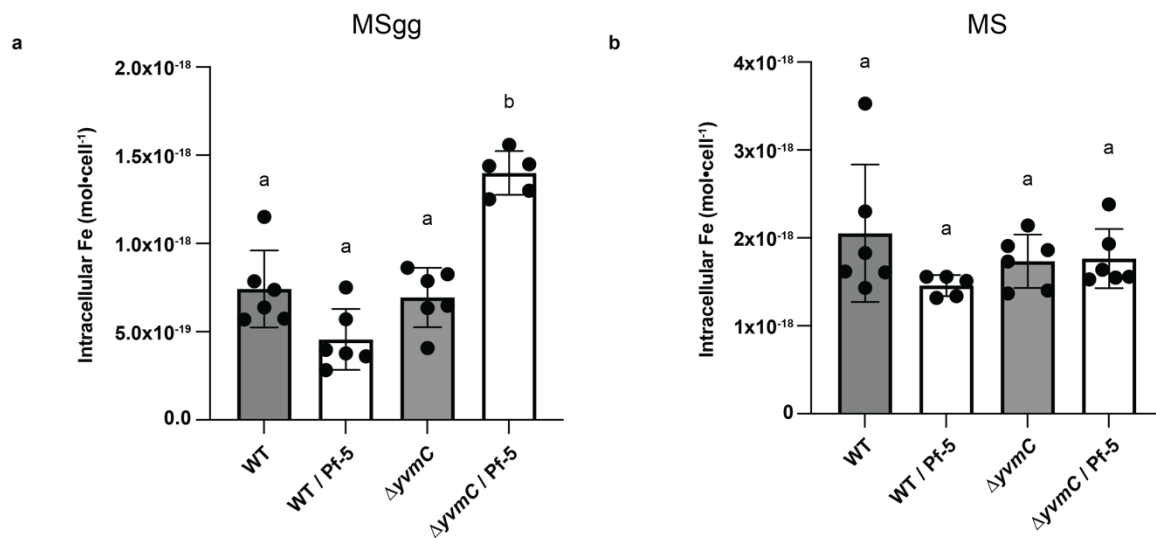


**Figure S4.2** Fluorescent microscopy of *B. subtilis* in interspecies competition with WCS365, WCS358, Pf-5, and purified DAPG.

**a**, Fluorescent images (false color) of *B. subtilis* ( $P_{yvmC}$ -yfp) alone on MSgg after 24 h. **b**, Flow cytometry analysis of YFP+ cells ( $P_{yvmC}$ -yfp) after 24 h of growth on MSgg. Data are presented as mean values  $\pm$  SD,  $n=3$  **c**, Fluorescent images (false color) of *B. subtilis* WT alone and in presence of WCS365, WCS358, and Pf-5 on MS medium after 24 h of growth. Scale bar, 5 mm. **d**, DAPG was spiked at 0.2 cm, 0.5 cm, 0.7 cm,

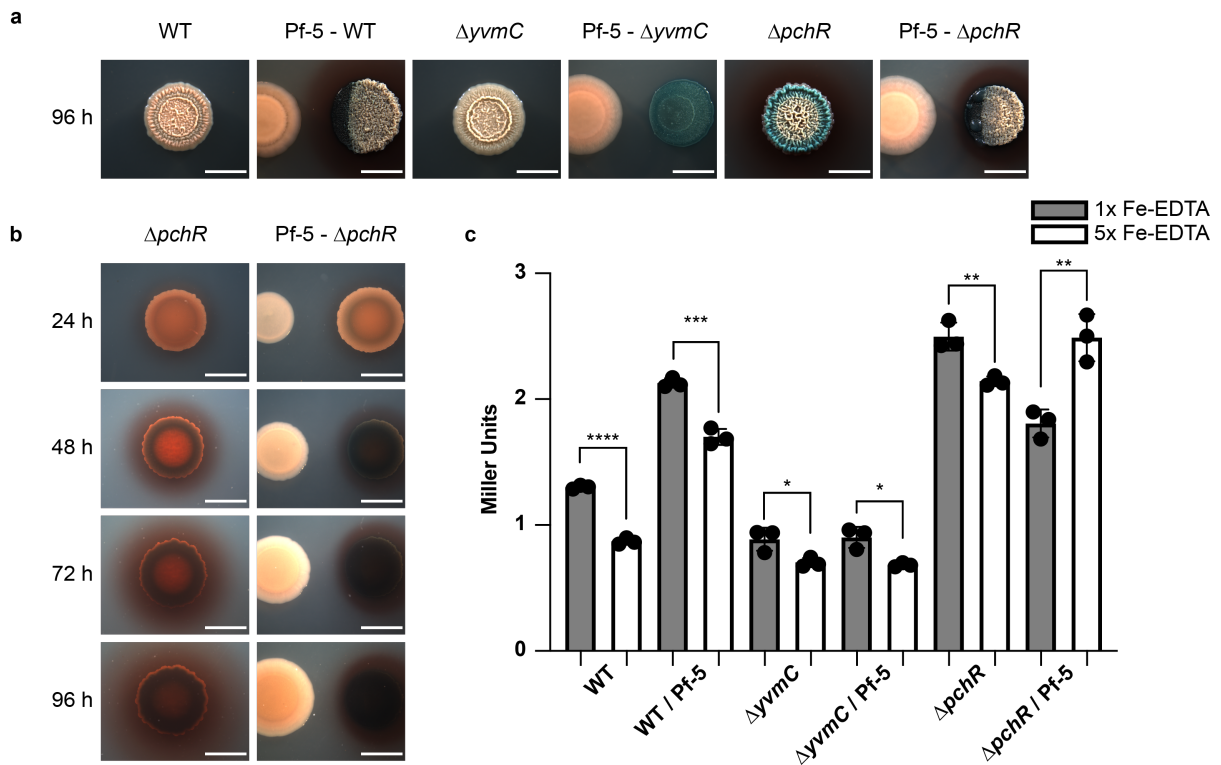


and 1 cm next to the colonies on a white absorbent paper. Upper row shows brightfield images and the lower row shows fluorescent images ( $P_{yvmC} - yfp$ ). As a control, 50% EtOH was spiked at 0.2 cm from the colony. All experiments were performed in three biological replicates with three technical replicates. Representative experiments and pictures are presented. Scale bar, 5 mm. Source data are provided as a Source Data file.



**Figure S4.3. Intracellular Fe concentration of WT and  $\Delta yvmC$  with and without Pf-5.**

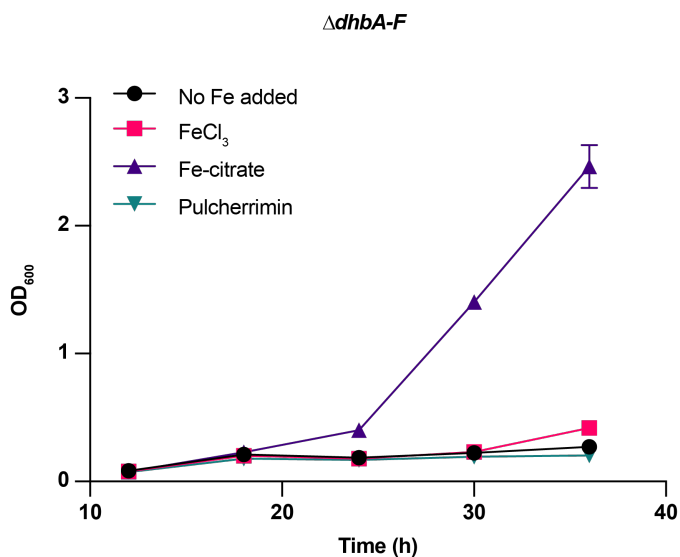
**a**, Intracellular Fe concentration (mol·cell<sup>-1</sup>) of 48 h colonies formed on MSgg and **b**, on MS medium. Different letters indicate statistically significant differences, P < 0.05, one-way ANOVA and Tukey's multiple comparisons test). Data are presented as mean values  $\pm$  SD, n=6. Source data are provided as a Source Data file.



**Figure S4.4. Pulcherrimin and Pf-5 induce  $P_{dhbA}$ - $lacZ$  expression in *B. subtilis*.**

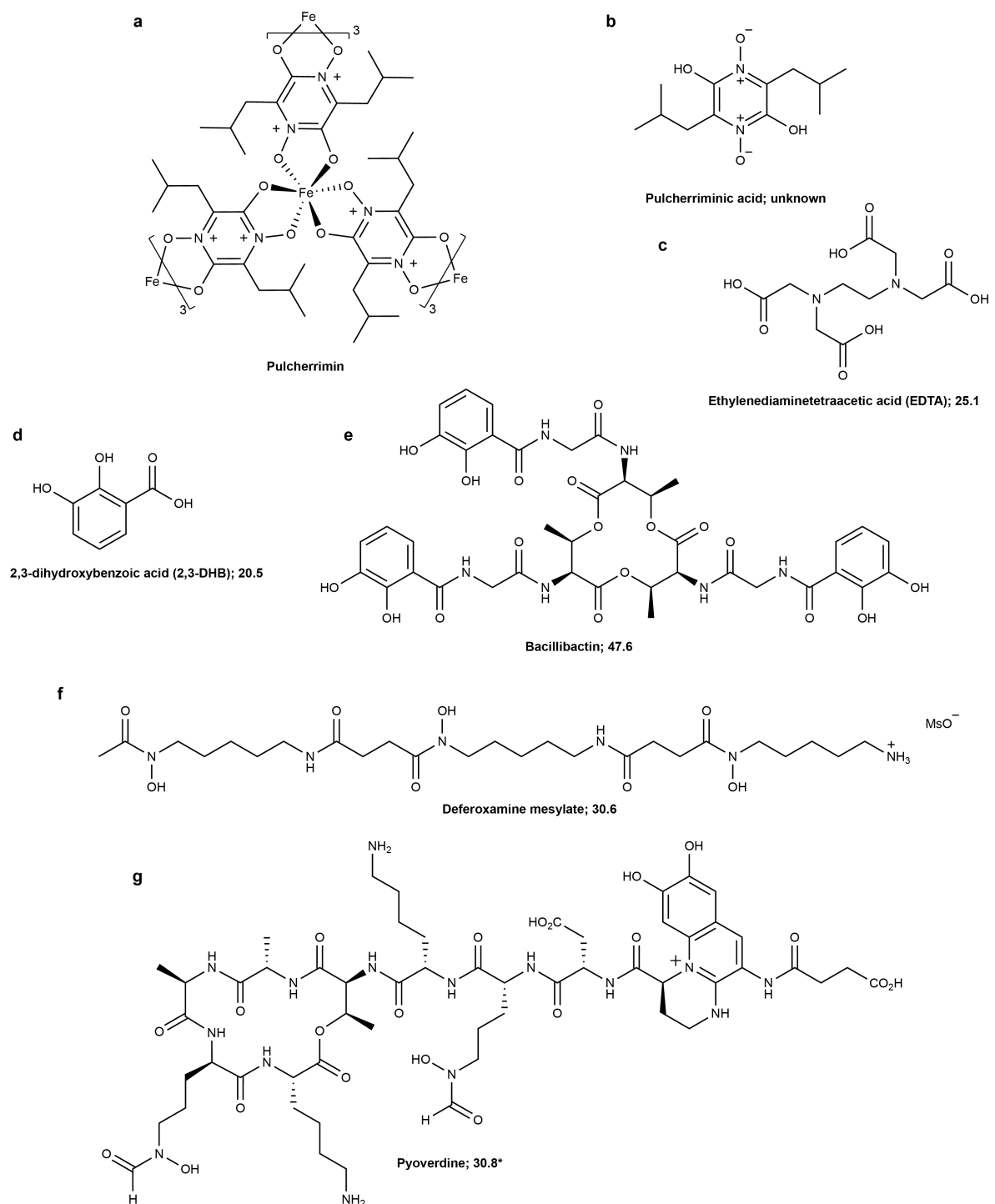
**a**, Top-view of representative images of biofilms from *B. subtilis* WT,  $\Delta yvmC$ , and  $\Delta pchR$  in interaction with Pf-5. Pictures were taken 96 h on MS supplemented with X-gal at 120  $\mu\text{g}/\text{mL}$ . **b**, Below-view of  $\Delta pchR$  mutant alone and in interaction with Pf-5 showing the spatial distribution of  $lacZ$ -producing cells at 24 h, 48 h, 72 h, and 96 h. Images contrast were adjusted to allow clear visualization. **c**,  $\beta$ -galactosidase activities of WT,  $\Delta yvmC$ ,  $\Delta pchR$  harboring the  $P_{dhbA}$ - $lacZ$  reporter alone and in interaction with Pf-5 in MS. Grey bars indicate 1x Fe(III)-EDTA and white bars indicate 5x Fe(III)-EDTA. (\* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ . \*\*\* $P = 5.52 \times 10^{-4}$ , \*\*\*\* $P = 1.32 \times 10^{-5}$ , Student's  $t$  test, two-sided). All experiments were performed in three biological replicates with three technical replicates. Representative experiments and pictures are presented. Data are

presented as mean values  $\pm$  SD, n=3. Scale bar = 5 mm. Source data are provided as a Source Data file.



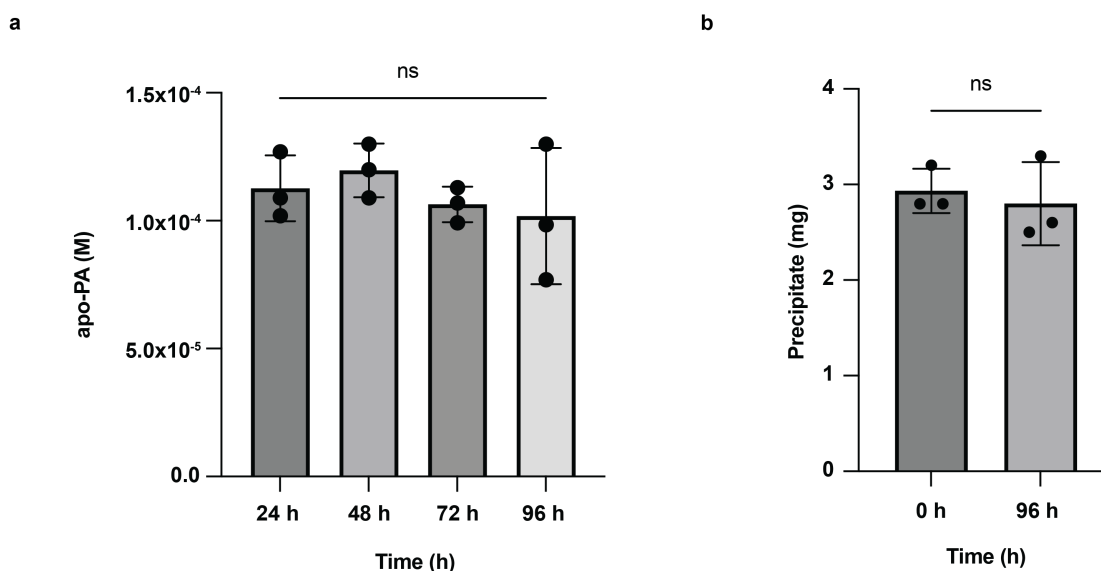
**Figure S4.5. *B. subtilis*  $\Delta$ dhbA-F does not grow in presence of pulcherrimin.**

*B. subtilis*  $\Delta$ dhbA-F growth was monitored (by absorbance at OD<sub>600</sub>) in MSgg medium. Optical density was measured every 6 h starting at 12 h post-inoculation (12 h, 18 h, 24 h, 30 h, and 36 h) in presence of no added Fe (negative control), 50  $\mu$ M FeCl<sub>3</sub>, 50  $\mu$ M pulcherrimin, and 50  $\mu$ M Fe-citrate (positive control) as Fe sources. This experiment was performed in three biological replicates with three technical replicates. Data are presented as mean values  $\pm$  SD, n=3. Source data are provided as a Source Data file.



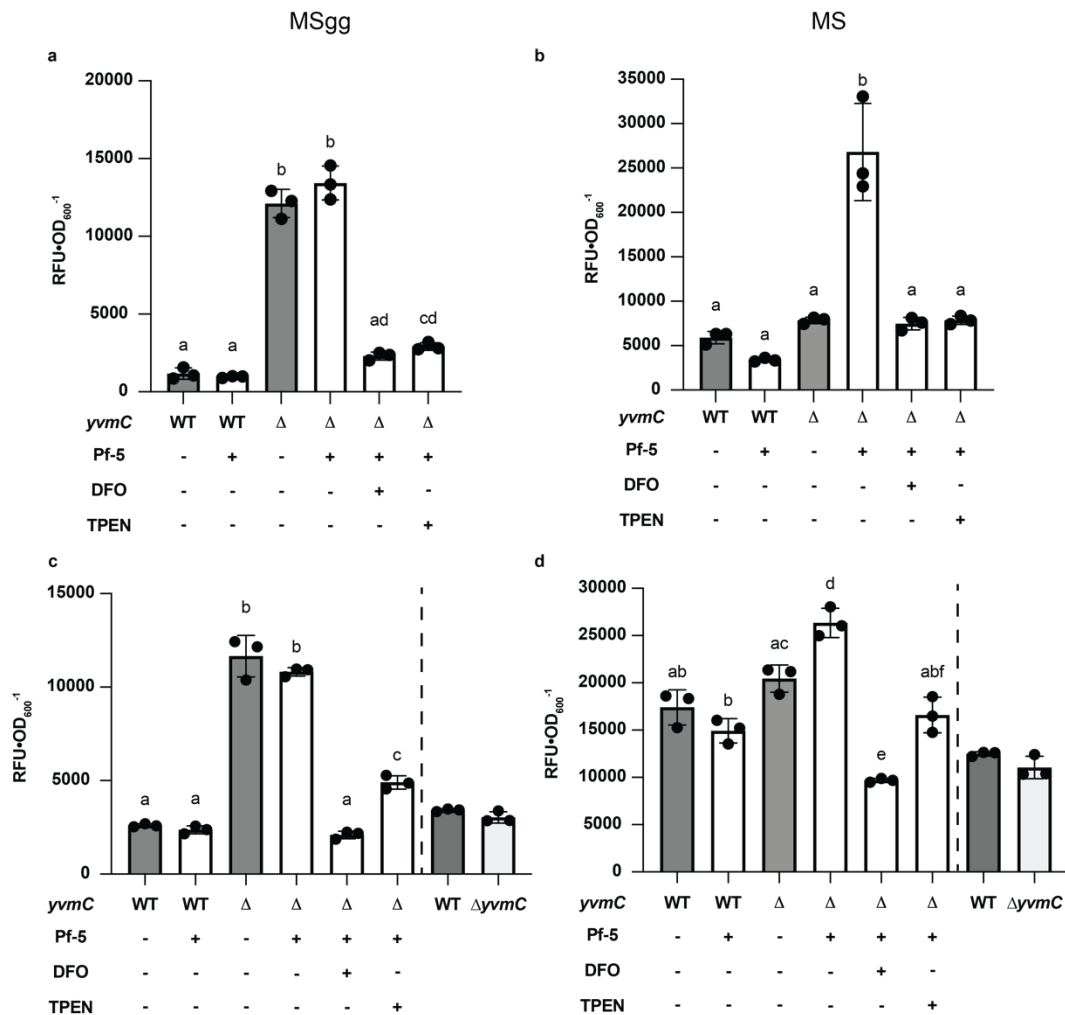
**Figure S4.6 Chemical structures of the molecules used throughout this study.**

**a**, The structure of pulcherrimin **b**, Pulcherriminic acid **c**, EDTA<sup>5</sup> **d**, 2,3-DHB<sup>6</sup> **e**, Bacillibactin<sup>7</sup> **f**, Deferoxamine mesylate<sup>8</sup> **g**, Pyoverdine<sup>9,10</sup>. The binding constant (log *K*) based of Fe(III)-complexes is indicated next to the name of the molecules. \* The binding constant is based on *P. aeruginosa*.



**Figure S4.7. The apo-PA and pulcherrimin remain stable over time in aqueous solution.**

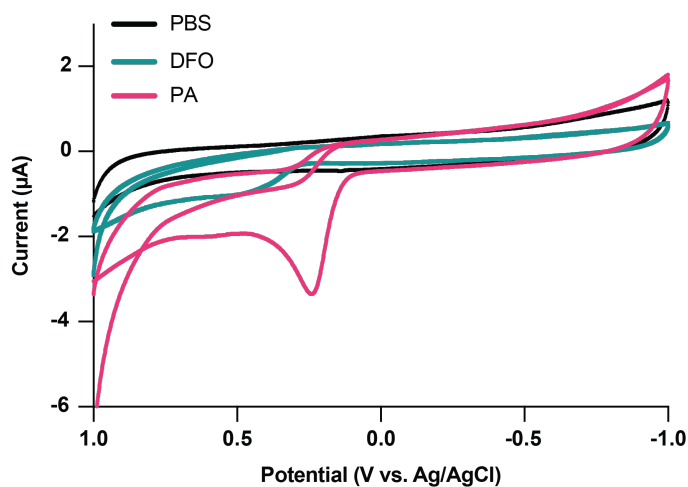
**a**, Apo-PA (soluble fraction) was quantified at 24 h, 48 h, 72 h, and 96 h without Fe by LC-MS to evaluate the stability over time. (ns; non-significant, one-way ANOVA and Tukey's multiple comparisons test). **b**, The pulcherrimin precipitate was weighted at 0 h and 96 h to evaluate pulcherrimin stability. (ns; non-significant, Student's *t* test, two-sided). Data are presented as mean values ± SD, n=3. Source data are provided as a Source Data file.



**Figure S4.8. Deferoxamine efficiently reduces intracellular oxidative stress compared to the metal chelator TPEN.**

**a**, Quantification of extracellular ROS using the DCFH<sub>2</sub>-DA probe in MSgg medium. Fluorescence intensities were normalized on biomass (OD<sub>600</sub>). DFO indicates that the siderophore deferoxamine mesylate was added to chelate Fe; TPEN indicates that N,N,N',N'-Tetrakis(2-pyridylmethyl)ethylenediamine was added as metal chelator with a strong zinc affinity. **b**, Same as in **a**, except that the experiment was conducted in MS medium. **c**, Quantification of intracellular ROS using the DCFH<sub>2</sub>-DA probe in MSgg medium. Conditions were the same as presented in **a**,

except that a ROS baseline (right of the dashed vertical line) has been added with cells growing exponentially in LB medium. **d**, Same as in **c**, except that the experiment was performed in MS medium. Experiments was performed in three biological replicates with three technical replicates. Different letters indicate statistically significant differences,  $P < 0.05$ , one-way ANOVA and Tukey's multiple comparisons test). Data are presented as mean values  $\pm$  SD,  $n=3$ . Source data are provided as a Source Data file.



**Figure S4.9. Cyclic voltammetry profile curves of Fe-free chelators.**

Cyclic voltammetry profile curves of DFO (deferoxamine; teal line), PA (pulcherriminic acid; pink line), and PBS (black line).

#### 4.2.7.1 References

1. Usui, I., Lin, D. W., Masuda, T. & Baran, P. S. Convergent Synthesis and Structural Confirmation of Phellodonin and Sarcodonin  $\epsilon$ . *Org Lett* 15, 2080–2083 (2013).
2. Nonappa, Ahonen, K., Lahtinen, M. & Kolehmainen, E. Cyclic dipeptides: catalyst/promoter-free, rapid and environmentally benign cyclization of free amino acids. *Green Chemistry* 13, 1203–1209 (2011).
3. Dickschat, J. S., Reichenbach, H., Wagner-Döbler, I. & Schulz, S. Novel Pyrazines from the Myxobacterium *Chondromyces crocatus* and Marine Bacteria. *European J Org Chem* 2005, 4141–4153 (2005).
4. Koo, B. et al. Libraries for *Bacillus subtilis*. *Cell Syst* 4, 291-305.e7. (2017).
5. Allen, H. E. & Chen, P.-H. Remediation of metal contaminated soil by EDTA incorporating electrochemical recovery of metal and EDTA. *Environmental Progress* 12, 284–293 (1993).
6. Avdeef, A., Sofen, S. R., Bregante, T. L. & Raymond, K. N. Coordination chemistry of microbial iron transport compounds. 9. Stability constants for catechol models of enterobactin. *J Am Chem Soc* 100, 5362–5370 (1978).
7. Dertz, E. A., Xu, J., Stintzi, A. & Raymond, K. N. Bacillibactin-Mediated Iron Transport in *Bacillus subtilis*. *J Am Chem Soc* 128, 22–23 (2006).
8. Bellotti, D. & Remelli, M. Deferoxamine B: A Natural, Excellent and Versatile Metal Chelator. *Molecules* vol. 26 Preprint at <https://doi.org/10.3390/molecules26113255> (2021).
9. L., H. S. et al. Ferric-Pyoverdine Recognition by Fpv Outer Membrane Proteins of *Pseudomonas protegens* Pf-5. *J Bacteriol* 195, 765–776 (2013).
10. Albrecht-Gary, A.-M., Blanc, S., Rochel, N., Ocaktan, A. Z. & Abdallah, M. A. Bacterial Iron Transport: Coordination Properties of Pyoverdin PaA, a Peptidic Siderophore of *Pseudomonas aeruginosa*. *Inorg Chem* 33, 6391–6402 (1994).



## CHAPITRE 5

### DISCUSSION ET CONCLUSION

#### 5.1 La formation d'endospores sur la plante

##### 5.1.1 La plante tolère *B. subtilis*

La formation d'endospores permet à *B. subtilis* de résister aux conditions environnementales difficiles et de survivre en attendant de meilleures conditions. Cependant, cette stratégie pourrait nuire aux effets bénéfiques apportés par *B. subtilis*, qui nécessitent que cette dernière soit métaboliquement active.

Nos résultats montrent que sur la racine, les cellules ne restent végétatives que pendant une courte période avant de retourner sous forme de spores (Figure 2.1). En effet, après l'inoculation des spores sur des graines, elles se différencient en cellules végétatives et la population reste majoritairement active (~70% de cellules actives). La phase de germination des spores est accompagnée d'une phase de croissance des cellules jusqu'à atteindre un plateau. Après 3 jours, il y a sporulation massive de la population (Figure 2.1b), qui devient alors principalement composée de spores (~70% de cellules dormantes). Ces résultats sont similaires à ceux décrits dans une étude sur des plantules de maïs, où la population d'espèces de *Bacillus* reste stable en fonction de leur inoculation ( $10^2 - 10^7$ ) (Mendis et al., 2018). Dans cette étude, comme la nôtre, les bactéries ont été appliquées sous forme de spores et il est possible qu'elles ne se soient pas différenciées en cellules végétatives, ce qui expliquerait l'absence de croissance. Cependant, cette étude n'a pas quantifié les spores dans la population bactérienne.

Une autre étude a montré que sur des feuilles de melon, les cellules restent actives pendant seulement 7 jours avant que la population soit dominée par des spores (80%) (Zerouh et al., 2014). Ce résultat n'est pas surprenant compte tenu de l'apport nutritionnel limité dans la phyllosphère.

Nos résultats, combinés à ceux de la littérature, suggèrent que la plante pourrait posséder des mécanismes actifs pour ralentir la croissance de *Bacillus* en induisant la sporulation. Sur cette base, nous avons décidé d'effectuer une caractérisation complète du processus de sporulation de *B. subtilis* en présence de la plante modèle *A. thaliana*. Tout d'abord, nous avons déterminé l'importance des histidine kinases KinA et KinB dans le déclenchement du processus de sporulation des cellules, ainsi que du récepteur de germination GerK dans la levée de la sporulation en présence de la plante. Ensuite, grâce à un système de culture hydroponique comprenant des inserts de culture cellulaire, des essais de complémentation avec du milieu résiduel et des bactéries mortes, nous avons mis en évidence qu'un ou des composés sécrétés par la plante induisent la formation des spores de *B. subtilis*. Nous supposons donc qu'un nombre excessif de bactéries dans l'environnement immédiat de la plante pourrait être nuisible. Par exemple, *B. subtilis* sécrète des enzymes qui dégradent les polysaccharides composant la paroi cellulaire végétale, causant possiblement des dommages à sa structure. Il est donc possible que la plante possède des mécanismes permettant le contrôle actif de la population pour éviter une dégradation excessive de sa paroi (Ochiai et al., 2007).

Nous avons de plus observé que la présence prolongée de cellules végétatives en interaction avec la plante dans un milieu minimal entraîne un brunissement des racines, perturbant ainsi la croissance racinaire. Les causes de ce brunissement racinaire ne sont pas élucidées, mais l'implication des espèces réactives de l'oxygène (ROS) et des modifications de la paroi cellulaire telles que la lignification et la subérification ont été suggérées dans la littérature (Hou et al., 2021). Dans l'ensemble, ceci suggère que la plante tolérerait une certaine quantité de *B. subtilis* métaboliquement actif, mais que

passé ce seuil, la plante subirait des dommages. Suivant la perception de ces dommages, la plante sécrèterait des molécules qui induiraient la sporulation et ralentirait la colonisation de *B. subtilis*.

### 5.1.2 La plante possède une capacité limite de colonisation

Des expériences d'évolution dirigée, c'est-à-dire un processus utilisé en laboratoire où des caractéristiques souhaitées pour un organisme dans un environnement défini sont sélectionnées par des cycles itératifs, permettent d'identifier les mutations qui augmentent le « fitness » d'un organisme. Par exemple, lorsqu'une expérience d'évolution dirigée de *B. subtilis* sur la plante est effectuée pour déterminer les traits adaptatifs, l'objectif est de déterminer les gènes favorisant une augmentation de la colonisation chez les isolats évolués par rapport à la souche ancestrale. Une première étude utilisant cette approche a montré une augmentation rapide de la colonisation des isolats évolués de *B. subtilis* sur *A. thaliana*, atteignant ensuite un plateau à environ  $10^6$  unités formatrices de colonies (UFC)/racine (Nordgaard et al., 2022). Une expérience similaire réalisée dans notre laboratoire sur des plantules de tomates a également montré une adaptation rapide de *B. subtilis*, atteignant également un plateau autour de  $10^6$  UFC/racine (voir Figure 2b de l'annexe 1). Bien que les isolats évolués surpassent la souche ancestrale, ils ne colonisent toujours pas la racine de manière homogène (résultats non montrés). Comme la composition des molécules sécrétées et de surface varie selon la région de la racine, il est probable que *B. subtilis* ne soit pas adaptée à proliférer dans toutes ces niches. En effet, certains microenvironnements racinaires pourraient être bénéfiques pour *B. subtilis* et favoriser sa croissance alors que d'autres favoriseraient plutôt sa sporulation, freinant ainsi sa colonisation sur l'entièreté de la racine.

Pour investiguer la colonisation de *B. subtilis* en temps réel, la microfluidique couplée à la microscopie a été utilisée. Cette approche a révélé que la colonisation de *B. subtilis*

début au niveau de la région d'élongation de la racine (Massalha et al., 2017). Les exsudats sécrétés de cette portion racinaire sont particulièrement riches en acides aminés et pourraient donc servir de chimio-attractants pour les bactéries. Suivant l'établissement de *B. subtilis* sur la racine, la plante procède à des changements métaboliques systémiques et libère différentes molécules de défenses telles que l'acylsucrose S1 :5, l'hydroxytomatine et la déhydrotomatine. Ces composés s'accumulent à des endroits spécifiques de la racine et pourraient avoir des conséquences négatives sur l'attraction des bactéries (Korenblum et al., 2020). Ensemble, l'exsudation racinaire systémique médiée par *B. subtilis* pourrait avoir des impacts sur l'activité métabolique des cellules environnantes les racines. Il serait donc intéressant d'évaluer l'effet de ces métabolites sur la chimiotaxie et la formation de spores chez *B. subtilis*.

## **5.2 Les effets de la sécrétion de l'acide pulcherriminique**

Avant le début de mes travaux de recherche doctoraux, seulement une poignée d'études s'étaient intéressées à la pulcherrimine et aucune ne la considérait dans un contexte de compétition microbienne. Mes observations que l'acide pulcherriminique est produite par *B. subtilis* en compétition interspécifique avec *P. protegens* nous suggérait un rôle important dans l'interaction. Cependant, très peu d'informations étaient disponibles sur les rôles physiologiques et écologiques de la pulcherrimine.

Les travaux présentés au chapitre 4 ont permis d'approfondir significativement ces rôles. La combinaison d'approche de microbiologie et de chimie analytique a permis de démontrer que la pulcherrimine n'est pas un sidérophore chez *B. subtilis* et qu'elle protège contre le stress oxydatif.

### 5.2.1 Au-delà de sa fonction de chélateur de Fe(III) – l'acide pulcherriminique comme mécanisme de protection contre les ROS et des dommages à l'ADN

À ce jour, la production de la PA était décrite dans la littérature comme étant constitutive, mais j'ai plutôt observé que sa synthèse est dépendante du milieu de culture. En effet, la production d'acide pulcherriminique est maximale en MSgg, un milieu minimal qui favorise la formation du biofilm (Figure S4.2b). À l'inverse, sur milieu MS où la formation du biofilm est moindre qu'en MSgg, seulement ~30% des cellules de la population produisent la PA (Figures 4.1c,d). Cette observation témoigne de la nécessité de varier les conditions de croissance afin d'élucider davantage de mécanismes de compétition microbienne et des signaux menant à la production des différents métabolites. Malgré les nombreuses similitudes entre ces deux milieux, la source de Fe est la principale différence. En MSgg, le Fe est sous forme  $\text{FeCl}_3$  (sel ; inorganique) alors qu'en MS, le Fe est sous la forme Fe(III)-EDTA (complexe organique).

La réaction de Fenton est à la base de la génération du stress oxydatif impliquant le Fe(II)/Fe(III) et mène à la production de  $\text{OH}^\cdot$  qui peut causer des dommages à l'ADN. En précipitant le Fe sous forme de pulcherrimine, les cellules tendent à accumuler moins de dommages à l'ADN (Angelini et al., 2023). En effet, la production de pulcherrimine par *B. subtilis* crée un environnement pauvre en Fe (Figure 4.3.). Cette stratégie d'apparence contre-intuitive permettrait de contrôler la vitesse d'entrée du Fe et sa concentration intracellulaire, ce qui limiterait la génération de ROS et subséquemment, des cassures d'ADN double brin.

Le Fe(III) lié à l'EDTA versus le Fe(III) libre peut avoir des effets différents sur la toxicité du Fe. En effet, par l'utilisation d'un mutant *yvmC* (ne produisant pas la PA), nous avons montré que la formation de la pulcherrimine en MSgg, présente même en absence de compétition bactérienne, prévient le stress oxydatif extracellulaire et intracellulaire

(Figure 4.6.). Cependant, en MS, le stress oxydatif provenant du Fe(III) est mitigé par sa complexation à l'EDTA, rendant la PA non nécessaire lorsque *B. subtilis* est seul. En présence d'un compétiteur qui exacerbe le stress oxydatif, les propriétés de chélateur de l'EDTA deviennent possiblement insuffisantes et la pulcherrimine s'accumule en grande quantité, posant l'hypothèse d'un seuil de stress oxydatif au-delà duquel il est nécessaire de produire la PA (Hong et al., 2019). En effet, la production de ROS induit des dommages à l'ADN qui prévient la différenciation des cellules motiles en cellules productrices de matrices extracellulaires, ce qui démontre un rôle important à la pulcherrimine pour la formation du biofilm (Gozzi et al., 2017).

### 5.2.2 La pulcherrimine produite en réponse au cyanure d'hydrogène ?

Nos résultats proposent que les signaux déclenchant la production de la PA sont multifactoriels, posant l'hypothèse que la pulcherrimine joue un rôle important dans plusieurs situations. Tel que vu à la Figure 4.1d, la présence de molécule(s) volatile(s) produite par Pf-5 induit la sécrétion de la PA.

Le rôle des composés volatiles produits par *P. protegens* dans la compétition interspécifique reste sous-étudié (Schmidt et al., 2015). Par exemple, *P. protegens* sécrète du cyanure d'hydrogène (HCN) qui a pour cible le cytochrome c oxydase et des métalloenzymes. Le HCN peut également lier le Fe inhibant la phosphorylation oxydative et éventuellement, inhiber la production d'ATP. Il est donc possible qu'en présence de HCN, *B. subtilis* développe une solution alternative pour maintenir l'équilibre redox intracellulaire en effectuant le transfert d'électron extracellulaire avec le Fe présent dans la pulcherrimine pour générer de l'énergie.

### 5.2.3 La pulcherrimine créerait une réserve locale de Fe et agirait comme bien commun

La liaison de l'acide pulcherriminique (PA) au Fe(III) crée un polymère rougeâtre qui précipite (Figure S4.6). La précipitation du complexe pulcherrimine et son insolubilité dans plus de 30 solvants organiques suggèrent fortement que la PA n'est pas un sidérophore (Kluyver et al., 1953). De plus, une étude récente a démontré que l'accumulation extracellulaire de pulcherrimine restreint l'expansion du biofilm et empêcherait la bactérie de récupérer le Fe(III) (Arnaouteli et al., 2019). Cette conclusion, du point de vue de l'évolution, est improbable. En effet, une carence en Fe induirait la mort cellulaire. Nous avons donc proposé une hypothèse alternative, selon laquelle la bacillibactine permettrait à *B. subtilis* de récupérer le Fe(III) de la pulcherrimine.

Nous avons fait le choix de travailler dans des conditions où la pulcherrimine est insoluble, car même si elle est soluble dans une base forte (par ex., NaOH 1 M), sa stabilité chimique s'en trouve alors fortement diminuée. En effet, la solution était instable et le complexe se dégradait rapidement en présence de lumière, alors que le complexe ferrique insoluble dans l'eau reste stable plusieurs jours (Figures S4.7-S4.8). Une expérience similaire avait été réalisée et publiée il y a plusieurs années, laquelle démontrait que la pulcherrimine était un sidérophore chez *Kluyveromyces lactis* (Krause et al., 2018). Malheureusement, la méthode d'extraction et de conservation de la pulcherrimine utilisée dans cette étude laissait supposer qu'elle était très probablement dégradée, jetant un doute sur la validité des résultats.

Dans le cadre de notre étude, nous avons pris soin de purifier la pulcherrimine en évitant les étapes de purification qui auraient pu altérer les groupements fonctionnels de liaison au Fe(III), et d'effectuer la synthèse complète de la PA (molécule sans Fe) en éliminant les impuretés, ce qui nous a permis d'obtenir des résultats fiables. Nous

avons observé que *B. subtilis* est incapable de récupérer le Fe de la pulcherrimine, et est incapable de croître en présence de FeCl<sub>3</sub> en l'absence de sidérophores, résultats qui contrastent ceux de Krause et al. (2018) (Figure 4.4.). Une expérience de croissance avec la pulcherrimine comme unique source de Fe(III) a aussi permis de montrer que l'utilisation des sidérophores 2,3-DHB et BB sont nécessaires pour récupérer le Fe(III) de la PA. Ces résultats ont aussi été confirmés par des essais de dissociation *in vitro* en utilisant la spectrométrie de masse (Figure 4.5.). Ensemble, ces résultats démontrent donc que la pulcherrimine n'est pas un sidérophore, mais servirait plutôt à créer une réserve locale de Fe à l'intérieur et à proximité du biofilm.

Nous nous sommes ensuite intéressés à savoir si l'espèce compétitrice pouvait avoir accès à cette réserve de Fe. Nous avons observé qu'en effet, *P. protegens* était capable de croître en présence de pulcherrimine comme seule source de Fe. Nous supposons donc que *P. protegens* pourrait potentiellement utiliser la même stratégie que *B. subtilis* pour récupérer le Fe(III) de la pulcherrimine, qui est d'utiliser les sidérophores telle que la pyoverdine. Comme la pulcherrimine peut être également dissociée par *P. protegens*, cela suggère qu'elle agirait comme bien commun pour tous organismes qui possèdent un sidérophore assez puissant pour pouvoir déloger le Fe(III) de la PA. Outre la dissociation du complexe par les sidérophores, le transfert d'électron extracellulaire (EET), utilisé par plusieurs microorganismes, pourrait aussi dissocier le Fe(III) de la pulcherrimine via sa réduction. Par exemple, *K. lactis* possède des gènes codant pour des métalloréductases qui permettent de réduire le Fe(III) en Fe(II) et potentiellement dissocier la pulcherrimine (Conde e Silva et al., 2009).

De manière intéressante, la PA partage une certaine similitude structurale avec les phénazines. Les phénazines sont des molécules redox actives qui permettent de faire le transfert d'électron extracellulaire en condition pauvre en oxygène (McRose & Newman, 2021). Dans un mécanisme semblable, la PA pourrait transférer des électrons au Fe(III) dans la pulcherrimine et ainsi rendre le Fe soluble dans les strates inférieures du biofilm où l'oxygène est limité, contribuant au maintien de l'activité



métabolique des cellules. Cette hypothèse est également appuyée par l'observation que le biofilm d'un mutant  $\Delta yvmC$ , qui ne produit pas la PA, ne devient pas épais et semble ainsi incapable de former une zone anoxique (Arnaouteli et al., 2019). Ainsi, la PA pourrait faire partie d'un mécanisme autosuffisant où elle entrainerait la réduction du Fe(III) de la pulcherrimine. La réduction du Fe(III) favoriserait la dissolution du complexe et participerait parallèlement à l'acquisition du Fe assisté par les sidérophores.

#### 5.2.4 *B. subtilis* est-il le premier bénéficiaire des effets de la pulcherrimine dans un environnement complexe ?

Piégeant le Fe(III) sous forme de précipité, l'acide pulcherriminique peut comporter de nombreux avantages compétitifs pour la bactérie productrice, mais aussi pour la communauté polymicrobienne dans laquelle cette dernière se retrouve. En effet, la pulcherrimine crée une réserve locale de Fe à proximité de la bactérie en limitant sa diffusion par le mouvement des fluides du sol. En trappant le Fe(III), elle prévient également son contact avec les ROS qui génèrerait du  $\text{OH}^-$ , toxique pour les cellules. Ainsi, l'aspect rougeâtre du biofilm suggère que le Fe est trappé sous forme de pulcherrimine dans le biofilm.

D'un point de vue d'un biofilm polymicrobien, elle pourrait conférer les mêmes avantages et pourrait également bénéficier à ceux qui possèdent les sidérophores nécessaires à la récupération du Fe(III). Cependant, il est également possible que ce bien commun soit plutôt une nuisance. En effet, l'accès à cette réserve nécessite inévitablement le coût métabolique important associé à la production des sidérophores, ce qui pourrait ralentir la croissance des espèces compétitrices et conférer un avantage à *B. subtilis*.

Bien que les effets de la pulcherrimine semblent s'étendre à une plusieurs organismes, nous ignorons quels sont les mécanismes mis en place par *Bacillus* qui lui permettrait d'en bénéficier avant les autres. Dans notre système expérimental, nous utilisons *B. subtilis* et *P. protegens* où *B. subtilis* produit la bacillibactine, un des sidérophores les plus puissants et *P. protegens* produit la pyoverdine (PYO), un sidérophore de forte affinité pour le Fe(III). Il existe une différence notable (~15 logs) entre la BB ( $\log K = 47.6$ ) et la PYO ( $\log K = 32$ ), ce qui pourrait conférer un avantage à *B. subtilis* dans la dissolution de la pulcherrimine. De plus, *B. subtilis* produit le 2,3-DHB, un sidérophore de faible affinité par rapport à la BB et qui peut, selon les conditions, agir comme réducteur. Ce système à deux composantes, c.-à-d., un de faible affinité et/ou réducteur et un de forte affinité, accentuerait la solubilisation du Fe(III) précipité par rapport à un système à une composante (Cheah et al., 2003; Z. Wang et al., 2015). Ensuite, du point de vue de l'espèce compétitrice, *P. protegens* Pf-5 croit de manière similaire à *B. subtilis* en présence de pulcherrimine, ce qui laisse supposer que Pf-5 possède les outils nécessaires pour contrecarrer la séquestration du Fe(III) par la pulcherrimine (Figure 4d). En effet, Pf-5 produit également deux sidérophores, un de faible affinité (pyocheline) et un de forte affinité (pyoverdine) ce qui, de manière comparable à *B. subtilis*, pourrait accélérer la dissolution de la pulcherrimine. Néanmoins, d'autres mécanismes permettraient à *B. subtilis* de monopoliser cette ressource. D'abord, la pulcherrimine se retrouve à proximité du biofilm de *B. subtilis* lui conférant un avantage pour l'acquisition du Fe(III). Ensuite, *B. subtilis* possède plusieurs récepteurs pour des xénosidérophores ce qui lui permettrait d'acquérir le Fe(III) de la pulcherrimine solubilisée par un xénosidérophore (Miethke, Kraushaar, et al., 2013).

#### 5.2.5 Des rôles possibles à l'acide pulcherriminique indépendamment du Fe(III)

Pour l'instant, uniquement les rôles de la PA en complexe avec le Fe(III) ont été explorés. Or, de multiples évidences suggèrent que l'acide pulcherriminique aurait des

rôles additionnels à celui de la complexation du Fe(III). D'abord, même si le Fe est pratiquement tout complexé, l'acide pulcherrimique est toujours produit (résultat préliminaire non-montré). Également, la PA est tout de même produite dans des conditions pauvres en Fe(III), renforçant l'hypothèse qu'elle aurait des fonctions supplémentaires à celles impliquant la liaison au Fe(III). Tout comme c'est le cas pour la majorité des sidérophores, la capacité de la PA à complexer d'autres métaux est sous-estimée. En effet, il est possible que la PA lie d'autres métaux de transition et contribue à maintenir l'homéostasie métallique générale. Par exemple, les molécules de type hydroxamate sont reconnues pour lier le Cu(II), le Zn(II) et le Ni(II) (Kurzak et al., 1992).

Finalement, l'acide pulcherriminique est une molécule appartenant à la famille des dicétopipérazines (DKP) qui sont des métabolites secondaires produits par plusieurs espèces bactériennes (Martins & Carvalho, 2007; Yao et al., 2018; Yuan et al., 2020). Plusieurs de ces DKP ont des propriétés antimicrobiennes, antifongiques, antivirales, antiprioniques, antitumorales et immunosuppressives (Martins & Carvalho, 2007). Aussi, une molécule de structure similaire produite par *Penicillium sp.*, la cyclo(dehydroala-L-Leu) inhibe de manière sélective l' $\alpha$ -glucosidase, représentant un potentiel agent anti-hyperglycémiant pour lutter contre le diabète (Kwon et al., 2000). Cet exemple illustre le potentiel inexploré de l'acide pulcherriminique.

## 5.3 Perspectives

### 5.3.1 Étudier le comportement de *B. subtilis* dans un environnement plus représentatif des conditions naturelles

Les expériences réalisées en monoassociation plante – bactérie ne réussissent pas à capturer les mécanismes complexes survenant en conditions naturelles. Pour combler ce besoin, la création de communautés synthétiques (SynComs) s'avère utile. Ces

SynComs peuvent aller de faible complexité (~5 espèces bactériennes) à haute complexité (au-delà de 100 espèces bactériennes) (Finkel et al., 2020; Schmitz et al., 2022). Ces SynComs permettent d'examiner en détail les relations de cause à effet du microbiote et de son hôte, ce que les techniques de culture indépendante échouent à déterminer.

Afin d'examiner l'incidence du microbiote sur la formation de spores de *B. subtilis* NCIB 3610 et ses mécanismes adaptatifs, il serait donc pertinent de créer une communauté synthétique et d'y inclure notre souche modèle *B. subtilis* NCIB 3610. Par exemple, il a été rapporté dans la littérature que *P. chlororaphis*, via la production de l'effecteur Tse1 par le T6SS, induit la sporulation de *B. subtilis* (Pérez-Lorente Alicia I. et al., 2023). Il est donc fort possible que cette modulation de la dormance par le microbiote racinaire affecte l'activité bénéfique conférée à la plante. De plus, le laboratoire dispose déjà des constructions génétiques fluorescentes (par ex.,  $P_{cheA}$ -yfp ; motilité,  $P_{tapA}$ -yfp ; biofilm,  $P_{sspB}$ -cfp, sporulation) permettant d'évaluer tous les stades de développement de *B. subtilis*. Il ne suffirait que de générer une collection bactérienne d'une espèce de plante et de créer un SynCom stable pour y examiner la différenciation de *B. subtilis*.

### 5.3.2 Déterminer les causes menant à la sécrétion de la PA

Nos travaux n'ont pas encore permis de révéler les signaux déclenchant la production de l'acide pulcherriminique. Toutefois, après avoir démontré que la PA est produite en présence de *P. protegens* et non produite en présence de *P. fluorescens* et *P. capeferrum*, des analyses de génomique comparative pourrait être effectuées. En effet, en révélant les différences au niveau des gènes présents entre ces trois espèces, nous obtiendrions des cibles potentielles expliquant la production de pulcherrimine. On sait également que la présence d'un volatile induit la sécrétion de la PA. Dans l'optique d'utiliser une approche de chimie analytique, une analyse de type non ciblée avec un GC-MS (*Gas Chromatography-Mass Spectrometry*) permettrait d'évaluer les

différences dans les composées volatiles produites par les espèces de *Pseudomonas*. Ayant révélé une partie des conséquences écologiques et physiologiques de la PA, comprendre les signaux menant à sa production permettrait d'émettre de nouvelles hypothèses quant aux fonctions de la PA indépendamment du Fe(III).

### 5.3.3 Évaluer les cinétiques de dissolution de la pulcherrimine en présence de sidérophores

Notre étude suggère l'hypothèse que la pyoverdine produite par *P. protegens* pourrait permettre la récupération du Fe(III) de la pulcherrimine, mais ceci n'a pas été démontrée *in vitro*. En effet, nous avons déterminé que croissance de *B. subtilis* et *P. protegens* semble comparable en présence de pulcherrimine (Figure 4.4b). Les analyses *in vitro* avec la pyoverdine confirmeraient qu'elle dissocie bel et bien le complexe. De plus, comme la pulcherrimine soutient une croissance rapide, elle ne semble pas ralentir l'acquisition du Fe(III) chez *P. protegens*. Cependant, il est possible que d'autres procaryotes et eucaryotes ne possèdent pas de sidérophores suffisamment fort pour retirer le Fe(III) de la pulcherrimine. Dans ce cas, la pulcherrimine monopoliserait le Fe(III) pour l'espèce productrice.

### 5.3.4 Les rôles de la pulcherrimine dans son environnement naturel, la rhizosphère

Nos résultats montrent que la PA agit comme molécule antioxydante en précipitant le Fe(III). Dans l'optique de transposer ces connaissances à la rhizosphère, où *B. subtilis* est le plus fréquemment retrouvé, nous posons l'hypothèse que *B. subtilis* utilise ce mécanisme de protection contre la plante.

Nos connaissances sur les mécanismes moléculaires qui modulent le microbiote racinaire et son partage des ressources avec ses résidents demeurent limitées. Récemment, l'influence des coumarines sur la composition du microbiote de la racine

a été mise en évidence. Les coumarines, telles que la scopoletine, l'esculétine, la fraxétine et la sidérétine, sont produites et sécrétées par les racines en cas de carence en Fe (Harbort et al., 2020; Stringlis et al., 2018; Voges et al., 2019). Le gène *f6'h1* chez *A. thaliana* est responsable de la synthèse de ces coumarines, des molécules redox actives dont le rôle premier est de solubiliser le Fe(III) en effectuant sa réduction en Fe(II). Ainsi, *A. thaliana* assimile le Fe par acidification de son milieu et par la sécrétion des coumarines (Santi & Schmidt, 2009; Tabata et al., 2022). Comme bien d'autres molécules impliquées dans l'acquisition du Fe(III), la fonction des coumarines ne se limite pas à la mobilisation du Fe(III). La présence des coumarines dans l'environnement génère des ROS et donc, la pulcherrimine pourrait être utilisée par *B. subtilis* pour atténuer ce stress oxydatif. À noter, certaines espèces de *Pseudomonas* sont sensibles à la présence de coumarines, alors que d'autres peuvent récupérer le Fe(III) lié aux coumarines de façon sidérophore-indépendant (Harbort et al., 2020; McRose et al., 2023). Ces exemples illustrent la relation complexe qui existe entre l'hôte et son microbiote

Récemment, il a été découvert que *B. velezensis* utilise son système de sécrétion type 7 (T7SS) par *B. velezensis* en présence d'*A. thaliana* pour lui soutirer du Fe. L'effecteur YukE relâché par le T7SS s'insère dans la membrane plasmique végétale et mène à une fuite de Fe(III) (Liu et al., 2023). Alors que *B. subtilis* possède également l'effecteur YukE, il est possible que suivant cette fuite, la PA complexe ce Fe(III) pour en faire une réserve et prévenir les ROS. De plus, lorsque la plante détecte la présence de la flagelline (flg22) de *B. velezensis*, elle induit une poussée oxydative importante (Millet et al., 2010). Il est donc aussi possible que la pulcherrimine vienne contrecarrer ces deux autres sources de stress oxydatifs ayant pour source la racine.

## 5.4 Conclusion

Mes travaux de thèse ont permis de caractériser plus en détail la formation des spores de *B. subtilis* en présence de la plante *A. thaliana*. Cette interaction met en évidence la relation complexe qui existe entre la bactérie et son hôte soulignant une potentielle balance entre les effets bénéfiques et néfastes de *B. subtilis*. Malgré nos connaissances approfondies sur les mécanismes d'acquisition du Fe(III), notre étude a révélé un nouvel acteur dans la gestion de ce dernier, soit l'acide pulcherriminique dans un contexte de compétition interspécifique entre *B. subtilis* et *P. protegens*. Bien que nous ayons maintenant une meilleure compréhension du mécanisme de récupération du Fe(III) et de protection de la pulcherrimine, les signaux conduisant à sa production et son rôle dans la formation du biofilm restent à être étudiés.

Pour conclure, nous espérons avoir démontré l'importance de prendre en considération la formation de spores des espèces de *Bacillus* dans l'efficacité des biofongicides, un aspect qui était négligé jusqu'à présent. De plus, nous espérons avoir proposé de nouvelles recommandations dans l'application de *Bacillus* pour optimiser les chances de succès du produit à prévenir le développement des maladies végétales. Finalement, nos données ont fait progresser nos connaissances sur les mécanismes de gestion du Fe(III) chez les bactéries, ce qui est important pour comprendre comment les espèces créent et protègent leur niche **écologique**.

# ANNEXE 1

## A.1 Article en tant que co-auteur

### A.1.1 Référence

Pomerleau, M., **Charron-Lamoureux, V.**, Léonard, L., Grenier, F., Rodrigue, S., and Beaugard, PB. (2023). Adaptive Laboratory Evolution reveals biofilm regulating genes as key players in *B. subtilis* root colonization.

L'article sera soumis à *mSystems*.



## A.2 Article

### A.2.1 Page titre

**Title:** Adaptative Laboratory Evolution reveals biofilm regulating genes as key players in *B. subtilis* root colonization

**Authors:** Maude Pomerleau<sup>1</sup>, Vincent Charron-Lamoureux<sup>1</sup>, Lucille Léonard<sup>2</sup>, Frédéric Grenier<sup>1</sup>, Sébastien Rodrigue<sup>1</sup>, Pascale B. Beauregard<sup>1#</sup>

#### **Affiliations**

1 Département de biologie, Faculté des sciences, Université de Sherbrooke, Sherbrooke, Québec, Canada

2 Département de Génie Biologique, Université de Technologie de Compiègne, 60200 Compiègne, France

# Corresponding author; Pascale.B.Beauregard@USherbrooke.ca

### A.2.1 Abstract

Root-associated microorganisms play an important role in plant health, such as plant growth- promoting rhizobacteria from the *Bacillus* and *Pseudomonas* genera. Although bacterial consortia including these two genera would represent a promising avenue to efficient biofertilizer formulation, we observed that *B. subtilis* root colonization is decreased by the presence of *P. fluorescens* and *P. protegens*. To determine if *B. subtilis* can adapt to the inhibitory effect of *Pseudomonas* on roots, we conducted adaptative laboratory evolution experiments with *B. subtilis* in mono-association or co-cultured with *P. fluorescens* on tomato plant roots. Evolved isolates with various colony

morphology and stronger colonization capacity of both tomato plant and *A. thaliana* roots emerged rapidly from the two evolution experiments. Certain evolved isolates had also a better fitness on root in presence of other *Pseudomonas* species. Whole genome sequencing revealed that single nucleotide polymorphism (SNPs) in negative biofilm regulator genes *ywcC* or *sinR* were found in all independent lineages, suggesting their involvement in enhanced root colonization. These findings provide insights into the molecular mechanisms underlying *B. subtilis* adaptation to root colonization and highlight the potential of directed evolution to enhance beneficial traits of PGPRs.

### A.2.2 Introduction

Numerous microorganisms live and thrive close to plant roots and form a distinct microbiota playing an important role in promoting plant health (1). Certain plants were shown to actively select beneficial bacteria in the rhizosphere via the secretion of specific compounds in their exudates (2), stimulating an interaction that benefit both the plants and bacteria. One of these microorganisms is *Bacillus subtilis*, a Gram-positive, soil ubiquitous bacteria that was define more than 40 years ago as a plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR) (3). Many strains from the *Bacillus subtilis* species complex are widely used in agricultural settings due to their multiple beneficial effects on plants (4–7). They can have direct effects, such as increasing nutrient bioavailability and stimulating plant growth via the production of phytohormones (8,9). They can also serve as biocontrol agents, since secondary metabolites such as plipastatin and surfactin have antimicrobial activity against pathogens (7,10–12). *B. subtilis* can also prime the plant defense system by triggering the induced systemic resistance (2).

While many PGPR strains show strong, reproducible plant enhancements in controlled conditions, biofertilizers effects are variable in field conditions (13–16). Different factors can explain this lack of efficacy, such as the extent of the inoculant biological activity in the receiving matrices (17,18). For example, *Bacillus subtilis* was shown to rapidly sporulate when cells were introduced in bulk soil, thereby limiting their beneficial effect. Root exudates of certain plants, exposed or not to other microorganisms, can modulate this metabolically inactive state (19,20). A second factor is the inoculant capacity to establish in the rhizosphere in presence of the residing microbiota (17,18). Multiple interactions with the soil community can result in the inhibition of important traits for *B. subtilis* rhizosphere establishment (21,22).

One key factor for *B. subtilis* root colonization is its capacity to form biofilms on roots (6,23,24). The biofilm extracellular matrix of *B. subtilis* is composed of exopolysaccharides (EPS), protein fibers (TasA and TapA) and a small hydrophobin protein (BslA) (4,25). Poly- $\gamma$ -glutamic acids ( $\gamma$ -PGA), a secreted polymer, was also reported to play an important role in biofilm robustness and root colonization (26). In non-biofilm conditions, operons encoding for EPS synthesis and TasA/TapA are repressed by the transcriptional repressor SinR (4,25). Plant polysaccharides and malic acids, which are respectively present at the surface of the root and in root exudates, trigger a signalling pathway resulting in SinR inhibition and expression of matrix genes (23,27).

Adaptative Laboratory Evolution (ALE) experiments are a powerful tool to study adaptations of microbes to an environment (28). Performed in mono-association with a plant, these assays can lead to the emergence of strong mutualists traits and reveal the molecular mechanisms involved in colonization (29–32). Laboratory evolution of *B. subtilis* on *A. thaliana* led to the emergence of evolved isolates of various morphologies with increased root colonization by themselves or in combination (30,31). Some mutations were found to influence biofilm formation in presence of xylan and decreased motility, suggesting an evolutionary trade-off between those traits (30,32). One isolate was also shown to increase root colonization within a synthetic community (30).

Many *Pseudomonas* species are also characterized as PGPR, and several were co-isolated with *Bacillus* from the rhizosphere where they likely interact with each other (33–35). Even if the combination of these two genera can increase biocontrol abilities and plant growth, most interactions between them were reported to be antagonistic *in vitro* (22,36–39). For example, certain *Pseudomonas* can repress or disperse *B. subtilis* biofilm via the production of the secondary metabolite 2,4-diacetylphloroglucinol (DAPG) and rhamnolipids (21,40,41). These interactions likely impact *B. subtilis* capacity to strongly establish on plant roots.

In this study, we first observed that *Pseudomonas* species impaired the establishment of *B. subtilis* on the roots of *A. thaliana* and tomato seedlings. To determine if *B. subtilis* can evolve to overcome this challenge and what traits would be involved, we elaborated an ALE on tomato roots in which *B. subtilis* was challenged or not by *Pseudomonas fluorescens*. Evolved isolates with enhanced root colonization rapidly emerged. Multiple mutations were identified in the negative regulators of biofilm formation *ywcC* and *sinR* for both evolution experiments, which suggests that the ability to compete with *Pseudomonas* for root colonization is highly linked to biofilm formation.

### A.2.3 Results

#### A.2.3.1 *Pseudomonas* spp. impede *B. subtilis* colonization on seedlings

*In vitro* antagonism between *Pseudomonas* species and *B. subtilis* was often reported, but no studies have yet shown how these interactions translated on plant roots (21,22,36,42). We thus performed root colonization assays with *B. subtilis* NCIB 3610 in presence of three *Pseudomonas* species that are used as biocontrol agents (*P. fluorescens* WCS365, *P. capeferrum* WCS358, and *P. protegens* Pf-5) (43,44). *Arabidopsis thaliana* and tomato, grown in hydroponic conditions, were used for this assay since the outcome might be plant specific. *B. subtilis* colonization was quantified by colony-forming unit (CFU) enumeration for *A. thaliana*, while the dense biofilm formed on tomato roots made this technique imprecise. Consequently, we used an alternative method where *B. subtilis* constitutively expressed the fluorescence gene *mKate2* and the relative fluorescence unit present on the root was measured. As shown in Figure A1, *P. protegens* and, in a lesser extent, *P. fluorescens*, decreased *B. subtilis* presence on both plants, while *P. capeferrum* influenced *B. subtilis* establishment on *A. thaliana* only. These results points toward a general, plant-independent inhibitory effect of *Pseudomonas* on *B. subtilis* root colonization.

#### A.2.3.2 *B. subtilis* evolves rapidly on tomato plant roots

To determine if *B. subtilis* could adapt to root colonization in presence of a competitor, we performed a directed evolution assay in which we selected for *B. subtilis* cells able to colonize the root. Briefly, the ancestral strain *B. subtilis* NCIB 3610 was inoculated on tomato roots before being transferred to a new root every 24 h for a total of 21 cycles (Figure A2A). The experiment was performed with *B. subtilis* alone (*Bacillus*-Root Evolution; BRE) or with the addition of *Pseudomonas fluorescens* WCS365 acting as a

competitor (*Bacillus-Root-Pseudomonas* Evolution; BRPE). This strategy was chosen to help determine if the acquired mutations were specific for improved colonization, competition or shared between both evolution assays. *P. fluorescens* was chosen as the competitor strain in the BRPE experiment due to its moderate impact on *B. subtilis* colonization, as opposed to *P. protegens* which completely outcompeted *B. subtilis* during an evolution attempt (data not shown). We followed colonization of the six lineages (6 independent plants) at each cycle by evaluating the colonization of *B. subtilis* on root (Figures A2B and A2C). Of note, one of the lineages with *P. fluorescens* was lost due to contamination and is consequently not shown. Interestingly, the BRPE showed an upward trend in colonization capacity, while the BRE had a drop in the first cycles and ended approximately at the same colonization capacity than the starting point (Figures A2B and A2C).

As previously observed by Blake et al. 2021 (31), we noticed that different morphological variants emerged during the evolution and rapidly dominated the population with the ancestral strain morphology disappearing only a few cycles after the first appearance of a new variant. After 7, 14, and 21 strain cycles, six evolved isolates per lineage were cryopreserved by selecting differently shaped colonies after plating. The morphology of the frozen isolates was then compared, and we selected at least one strain of each morphology present in a lineage at a specific cycle to be sequenced. A total of 78 evolved isolates (36 for evolution alone and 42 for paired evolution) were sequenced. The analysis revealed that 31 of these isolates were clones of at least one other, and 12 isolates were perfect match of the ancestral strain. Of note, the ancestral strain was also re-sequenced to establish a strong basis for the analysis. Single nucleotide polymorphisms (SNPs) were the most frequent type of mutation for both evolution experiments, representing 69.4% of all mutations, compared with 3.2%, 3.2%, and 24.2% for insertions, synonymous variants, and deletions respectively. Overall, 62 different mutations were identified, of which 39 were found in the BRPE, 19 with the BRE, and 3 were shared between both (Tables S1 and S2). Even though more mutations were acquired by isolates evolved with *P. fluorescens*, the ratios of SNPs

over other different types of mutations between both evolution experiments were very similar (70% vs 69%).

Our analysis revealed that the BRPE led to more isolates with 2 or more mutations (17 out of 27) than the BRE (6 out of 13). Interestingly, all lineages from BRE bared a conserved SNP that appeared before the 7th cycle, contrasting with the paired evolution, where only two lineages maintained a conserved mutation from cycle 7 to 21 (Tables SA1 and SA2). All those observations suggest that the adaptation in a tri-partite system, with the root and *Pseudomonas* (BRPE), took longer than the adaptation to the host alone (BRE).

#### A.2.3.3 *Mutations in biofilm regulation genes are conserved amongst evolved isolates*

By cycle 21, we observed that SNPs in the negative biofilm regulator genes *sinR* or *ywcC* were found in all lineages. For the BRE, conserved SNPs in *ywcC* appeared in 3 independent lineages and SNPs in *sinR* appeared in the 3 other lineages (Table SA1). In the BRPE, SNPs in the two genes were also found in 3 lineages each but were not mutually exclusive since one lineage contained SNPs in both genes (Tables A2 and AS2). Apparition of these SNPs in parallel evolutions and lineages suggest that they confer an advantage to root colonization. We chose to further examine one evolved isolate per lineage for most lineages (BRE; Table A1) and three pairs of evolved isolates, each coming from different lineage and which display increase SNPs throughout the cycles (BRPE; Table A2). The latter allowed us to examine the effect of single SNPs versus a combination.



#### A.2.3.4 *Evolved isolates show enhances colonization in a plant-independent manner*

The competitiveness of the evolved isolates was first tested on tomato plants with or without *P. fluorescens*, in an experimental set up similar to the directed evolution assay. As shown in Fig 3A, most evolved isolates showed a 2-fold increase in root colonization capacity when inoculated alone. Similar results were obtained for colonization assays in presence of *P. fluorescens*, even from isolates that were evolved without the selective pressure of the competitor (Figure A3B). This observation suggests that the capacity to compete with *P. fluorescens* strongly correlates with an enhanced root biofilm formation capacity.

Hu et al. 2023 (32) recently reported that *B. subtilis* adapts differently to various plant species, as some mutations were detected more frequently when the evolution was performed on *A. thaliana* versus tomato plant roots. Another recent study observed that isolates evolved on *A. thaliana* roots did not have an improve root colonization of tomato plants (31). Here, as shown Fig 4, our tomato-evolved isolates from both evolution appeared to have some increased capacity to colonize *A. thaliana* roots. The results are however more variable, which might be due to the strength of the phenotype. Curiously, only two evolved isolates showed significant improvement of *A. thaliana* root colonization when inoculated alone (Fig 4A), but many showed increase colonization compared to the ancestral strain when *P. fluorescens* was present (Fig 4B). These observations suggest that evolution on tomato roots does not frequently lead to increase colonization of *A. thaliana*, but the increased competitiveness in presence of *P. fluorescens* is conserved on both plants.

#### A.2.3.5 *Evolved isolates compete better with other Pseudomonas species on roots*

As shown in Figure A1, other *Pseudomonas* species also negatively affect *Bacillus* root colonization. Thus, three of the evolved isolates showing the strongest colonization in presence of *P. fluorescens* (P3.a.C14, P4.b.C14 and P5.d.C21) were also tested in presence of four other *Pseudomonas*, inoculated individually at the same time. The species used, *P. protegens* and *P. stutzeri*, have with *P. fluorescens* WCS365 large difference in gene content, and thus likely use different antagonistic strategies against *B. subtilis* (45). Despite this, as shown in Figure A5 we observed that our evolved isolates showed stronger root colonization than the ancestral strain in presence of either of these *Pseudomonas* strain. This important result hints that the adaptation to *P. fluorescens* led to a general mechanism that also confers advantages in root colonization when another antagonistic member of the same genus is present.

#### A.2.3.6 *Impacts of the SNPS on the biofilm regulators functionality*

Evolved isolates showing better colonization in presence of *Pseudomonas* carry SNPs in *ywcC*, *sinR* and *dxr* (P3.a.C14), *ywcC* and *pksR* (P4.b.C14) and *sinR* and *dxs* (P5.d.C21; see Table A2). For *ywcC*, all the SNPs resulted in a frameshift or a stop codon, thus suggesting a loss-of-function, while the SNPs present in the other genes were missense variants. Since these SNPs provided an advantage when colonizing roots alone and in the presence of different *Pseudomonas*, we examined deletion mutants for *ywcC*, *sinR*, *pksR* and recreated the double mutants as found in the evolved isolates (Figure A6). Interestingly, only  $\Delta ywcC$  and  $\Delta ywcC \Delta pksR$  strains showed increased root colonization compared to the wild-type strain, further supporting that the SNPs in *ywcC* resulted in a loss-of-function. Conversely, a *sinR* deletion mutant did not

confer an increase in root colonization and even negated the advantage provided by  $\Delta ywcC$ , suggesting that the SNPs in *sinR* only partially reduced its function. Accordingly, the morphologies of  $\Delta sinR$  strains did not recapitulate the morphologies of the evolved isolates with *sinR* SNPs, further supporting this hypothesis (Figure SA1).

#### A.2.4 Discussion

In this study, we showed that the antagonism often observed between *Bacillus* spp. and *Pseudomonas* spp. is also observed on plant roots since two different *Pseudomonas* species negatively impacted *Bacillus* root colonization of both *A. thaliana* and tomato (Figure A1). This result could reflect direct antagonism via antimicrobial mechanisms, similar to what was previously described using pairwise interaction (21,22,36). The weaker inhibitory effect of *P. fluorescens* might be due to its lower number of secondary metabolites (46,47). However, the antagonism could also be indirect; these *Pseudomonas* could be better adapted to the root microenvironment, or capable of establishing faster on the roots, causing a physical displacement of *B. subtilis*.

The directed evolution on tomato roots, performed as a monoculture or in presence of *P. fluorescens* WCS365, allowed the emergence of different morphotypes of *B. subtilis* through time. Seven out of the total eleven lineages obtained at cycle 21 had only one morphotype present, while three other lineages had two morphotypes, and one lineage had four morphotypes (Tables SA1 and SA2). Whole genome sequencing revealed that multiple independent lineages from both evolutions shared SNPs in the same few genes, suggesting that evolutionary pressure came from the host and the experimental conditions more than the presence of the competitor. A few of our isolates evolved on tomato also had increased *A. thaliana* root colonization, showing the possibility of one strain being more fit on two different plants. Of note, presence of 0.05% glycerol in our

evolution assay might have relieved the pressure to adapt to specific carbon compounds present in the exudates.

Either *ywcC* or *sinR* were affected by SNPs in all independent lineage from both evolution experiments, stressing their importance for root colonization adaptation. Both genes encode for negative regulators of biofilm genes, and their deletion result in hyper-robust biofilm formation (24,48,49). The YwcC protein is a TetR-type transcriptional repressor that inhibits *slrA*, a *sinI* paralog. When expressed, SlrA inhibits SinR thereby derepressing matrix genes (48). Consequently, it was proposed that YwcC responds to a yet unknown environmental signal and alleviate its repression, allowing SlrA to transiently induce matrix production for the whole cell population (48,50). YwcC also repress poly- $\gamma$ -glutamic acids production, which were shown to play a notable role in plant root colonization (26). Evolved isolates harboring a frameshift mutation in the *ywcC* gene demonstrated enhanced root colonization compared to the ancestral strain, and their morphology suggested robust biofilm formation (Figure SA1). Thus, the mutations acquired during the evolution likely result in a loss of function, which is further supported by the fact that  $\Delta ywcC$  recapitulated *ywcC*\* evolved isolates phenotypes.

On the contrary, *sinR* loss-of-function did not increased root colonization, even in presence of *P. fluorescens* or in combination with  $\Delta ywcC$ , pointing toward a milder impact of the SNPs on SinR function. Certain evolved isolates with *sinR* SNP, such as A2.a.C14 from the evolution alone (125C>T; P42L in the DNA binding domain; (51)), had no impact on root colonization while displaying a different morphology than the ancestral strain. However, one specific mutation, found in both evolution assays, seemed to enhance root colonization (296T>C; L99S). This mutation might impair SinR capacity to form a functional tetramer and thus, partially reduce its capacity to repress target genes (52). These observations are in accordance with the observation similar results of evolved isolates on *A. thaliana* roots in which robust biofilm formers had an increase in root colonization (30).

The paired evolution led to the emergence in lineage 4 of a conserved mutation in the *pksR* gene. This gene is part of the *pks* gene cluster, encoding for an enzymatic megacomplex that synthesizes bacillaene, an antimicrobial compound (53). However, this SNP alone (evolved isolate P4.a.C7) did not confer any advantage when colonizing tomato or *A. thaliana* roots, contrary to when this mutation was combined with a SNP *ywcC* (P4.b.C14), suggesting that the latter SNP was responsible of the adaptation.

Finally, SNP in two essential genes involved in the MEP pathway of isoprenoid biosynthesis were identified in two independent isolates of the paired evolution showing stronger roots colonization (P3.a.C14 and P5.d.C21) (Table A2, *dxr* and *dxs*). While the increased fitness by P3.a.C14 can be attributed to a frameshift mutation in *ywcC*, in P5.d.C21 the *dxs* mutation is accompanied only by a *sinR* SNP that has little to no effect by itself (see P5.a.C14 in Figure A3B and Figure A4B), indicating this *dxs* SNP had positive effect on the roots. Since *dxs* and *dxr* are essential genes, the mutations are at best a partial loss-of-function; further experiments will be required to determine the reason behind these beneficial effects.

Overall, directed evolution performed alone or in presence of *P. fluorescens* lead to parallel evolution of SNPs in a few genes that conferred a mild deregulation of biofilm genes. These evolved isolates showed increase presence on the root compared to the ancestral strain, alone or with various *Pseudomonas* species. Our study indicates that rhizosphere fitness in presence of a competitor is closely linked to robust root colonization and physical establishment.

## A.2.5 Materials and Methods

### A.2.5.1 *Bacteria strains and culture conditions*

Strains used in this study are listed in Supplementary Table A3. *B. subtilis* strains were routinely cultivated in lysogeny broth (Luria-Bertani LB; 1% w/v tryptone, 0.5% w/v yeasts extract, 0.5% w/v NaCl) at 37 °C in agitation for 3 h. *Pseudomonas* strains were cultivated in LB at 30 °C in agitation for 3 h. Experimental evolution and all root colonization assays were performed in half strength Murashige and Skoog (MS) basal medium (2.22 g L<sup>-1</sup>, Sigma) supplemented with 0.05% glycerol. When necessary, antibiotics were used at the following concentrations: spectinomycin (100 µg×mL<sup>-1</sup>), kanamycin (10 µg×mL<sup>-1</sup>), chloramphenicol (5µg×mL<sup>-1</sup>), erythromycin (1µg×mL<sup>-1</sup>).

### A.2.5.2 *Seedlings preparation*

*A. thaliana* ecotype Col-0 and tomato (*Solanum lycopersicum*, Rutgers, McKenzie seeds, CA and Greta's Family Gardens, CA) were used in this study. Seeds were surfaced sterilized with 70% v/v ethanol followed by 0.3% v/v sodium hypochlorite then rinsed three times with sterile MiliQ water and plated on Murashige and Skoog basal medium (4.44 g L<sup>-1</sup>, Sigma) 0.8% w/v agar supplemented with 0.05% w/v glucose. Plates were incubated in a growth chamber with a day/night cycle of 12 h light at 25°C and 12 h dark at 20°C. *A. thaliana* seedlings for 7 days and tomato seedlings for 5 or 6 days.

### A.2.5.3 *Strains constructions*

All genetically modified strains were made by transferring genetic constructions into NCIB3610 or evolved isolates using SPP1-mediated generalized transduction (54). All deletion mutants used in this study were purchased from the Bacillus Genetic Stock

Center (BGSC) collection (<http://www.bgsc.org>) in the *B. subtilis* 168 background. *Pseudomonas* strains *P. fluorescens* WCS374, *P. stutzeri* RCH2 and *P. protegens* CHA0 were obtained from Cara Haney (UBC).

#### A.2.5.4 *Experimental evolution*

Tomato seedlings were transferred to 6-well plates containing 4 mL of ½ MS + 0.05% v/v glycerol (2 seedlings/plate in opposite corners to prevent contamination between lineages). *B. subtilis* NCIB3610 culture was washed in PBS and inoculated at a final optical density at 600 nm (OD<sub>600</sub>) of 0.02. Plates were put on a shaker at 90 rpm in the growth chamber in the same conditions than for seedlings preparation. **Evolution alone (BRE):** After 24 h, the root was detached from the stem using tweezers, rinsed in PBS and sonicated at 30% amplitude for 30 s in a microtube containing 1 mL PBS. 133 µL of the bacterial suspension was inoculated on a new plant and the suspension was diluted and plated to follow the number of bacteria transferred every cycle. **Evolution with *Pseudomonas* (BRPE):** After 24 h, *P. fluorescens* WCS365 was inoculated in each well containing a *B. subtilis* colonized root at a final OD<sub>600</sub> of 0,0002, which correspond approximately to a 100 : 1 *Bacillus* : *Pseudomonas* ratio, and reincubated in the growth chamber for 24 h. Any lower *Bacillus* : *Pseudomonas* ratio lead to the rapid disappearance (not shown). Root was then detached, washed, and sonicated (40% amplitude, 60 s), which killed 99% of the *Pseudomonas*. 133 µL of the bacterial suspension was then inoculated on a new plant and the suspension was diluted and plated to follow the number of bacteria transferred every cycle. For the cycles 3 to 21, *P. fluorescens* was added after 24 h at each cycle at a final OD<sub>600</sub> of 0,00002, or approximately  $7,3 \times 10^3$  CFU/mL (OD<sub>600</sub> of 0,6 =  $2,2 \times 10^3$  CFU/mL). Considering the *B. subtilis* CFU number on the root (see Fig 2c), this *P. fluorescens* inoculum corresponds to a *Bacillus* : *Pseudomonas* ratio of around 1:10 to 100:1, depending on the lineage and the cycle.

#### A.2.5.5 Whole genome sequencing

Genomic DNA was extracted from 9 mL of 3 h cultures using Monarch® Genomic DNA Purification Kit. Paired-end (evolution alone) or single-end (evolution with *Pseudomonas*) libraries were prepared using the NEBNext® Ultra™ II DNA Library Prep with Sample Purification Beads. Fragment reads were generated on an Illumina NextSeq sequencer using TG NextSeq® 500/550 High Output Kit v2 (300 cycles) (RNOMique Platform, UdeS). The methodology for processing the reads drew inspiration from the GenPipes framework (55). We first implemented a quality-based trim of the reads using fastp 0.21.0 (56), setting the parameters to --cut\_right --cut\_window\_size 4 --cut\_mean\_quality 30 --length\_required 30. The trimmed reads were subsequently mapped to the reference *Bacillus subtilis* 3610 and its plasmid pBS32, procured from GenBank (CP020102.1 and CP020103.1), using BWA-MEM v0.7.10 (57) with no modification of the default parameters. Upon alignment, we sorted the reads with Picard v1.123, available online at <https://broadinstitute.github.io/picard/>, and realignment was executed with the GATK v3.7 RealignerTargetCreator and IndelRealignerSingle tools (58). Following the identification and marking of duplicate reads with Picard v1.123, we utilized GATK v3.7 for haplotype identification. Subsequently, their impacts were evaluated using SnpEff v4.1 (59).

#### A.2.5.6 Colonization assays

Evolved isolates formed very robust biofilm on root surface, so CFU counting to quantify root colonization was unreliable since clumps of bacteria could not be separated by sonication. We developed two methods that allowed us to quantify relative root colonization regardless of clumps, using a constitutive fluorescent reporter that was transduced into all strains tested. **For tomato:** *B. subtilis* and evolved mutants were transduced with the *amyE::P<sub>hyperspank</sub>-mkate2*, and then inoculated on roots as described in the evolution assay on tomato plants. For the condition in presence of



*Pseudomonas*, both species were inoculated at the same time and at the same OD (OD<sub>600</sub> = 0.02). After 24 h, the roots were detached and transferred in a microtube containing 500 µL PBS with three 3 mm glass beads. Roots were vortexed for 30 s and sonicated at 40% amplitude for 20 s. 200 µL of the supernatant was transferred to a 96-well plate and the fluorescent intensity was measured with a TECAN Spark monochromator-based with an excitation wavelength of 590 nm and emission wavelength of 638 nm, bandwidth 20. A calibration curve using this method is shown in Fig S2. **For *A. thaliana*:** The assays were performed in 48-well plates containing 280-290 µL of media. Bacteria were either detached from root using sonication (amplitude 30%, 10 pulses 1-s pulse and 1-s rest time), diluted, and plated on solid LB media to allow CFU counting, or bacterial colonization was quantified in microscopy (see Microscopy section).

#### A.2.5.7 *Microscopy*

To visualize bacteria on root surface for Fig 1, seedlings were examined with a Zeiss Axio Observer Z1 microscope equipped with a 20X/0.8 Plan-Apochromat objective, and whole root pictures were taken with a Zeiss AxioCam 506 mono. The fluorescence signal was detected using a Cy3 filter (ex: 545/25, em: 605/70). All images were taken at the same exposure time, processed identically, and prepared for presentation using ImageJ. Each image is representative of at least 9 roots colonization assays performed in three independent experiments. Quantification was done using Fiji. Root area was delimited, and relative root colonization was calculated by dividing the mean fluorescence intensity on the average intensity for the ancestral strain of the same experiment. Fig S1 was obtained using the stereo microscope Leica M165 FC with the LeicaMC170HD camera.

#### A.2.5.8 *Statistical analysis*

Statistical analyses were performed using GraphPad Prism 9. Comparisons were done as specified in the figure legends. Normality was tested using Shapiro-Wilk test.

#### A.2.5.9 *Acknowledgements*

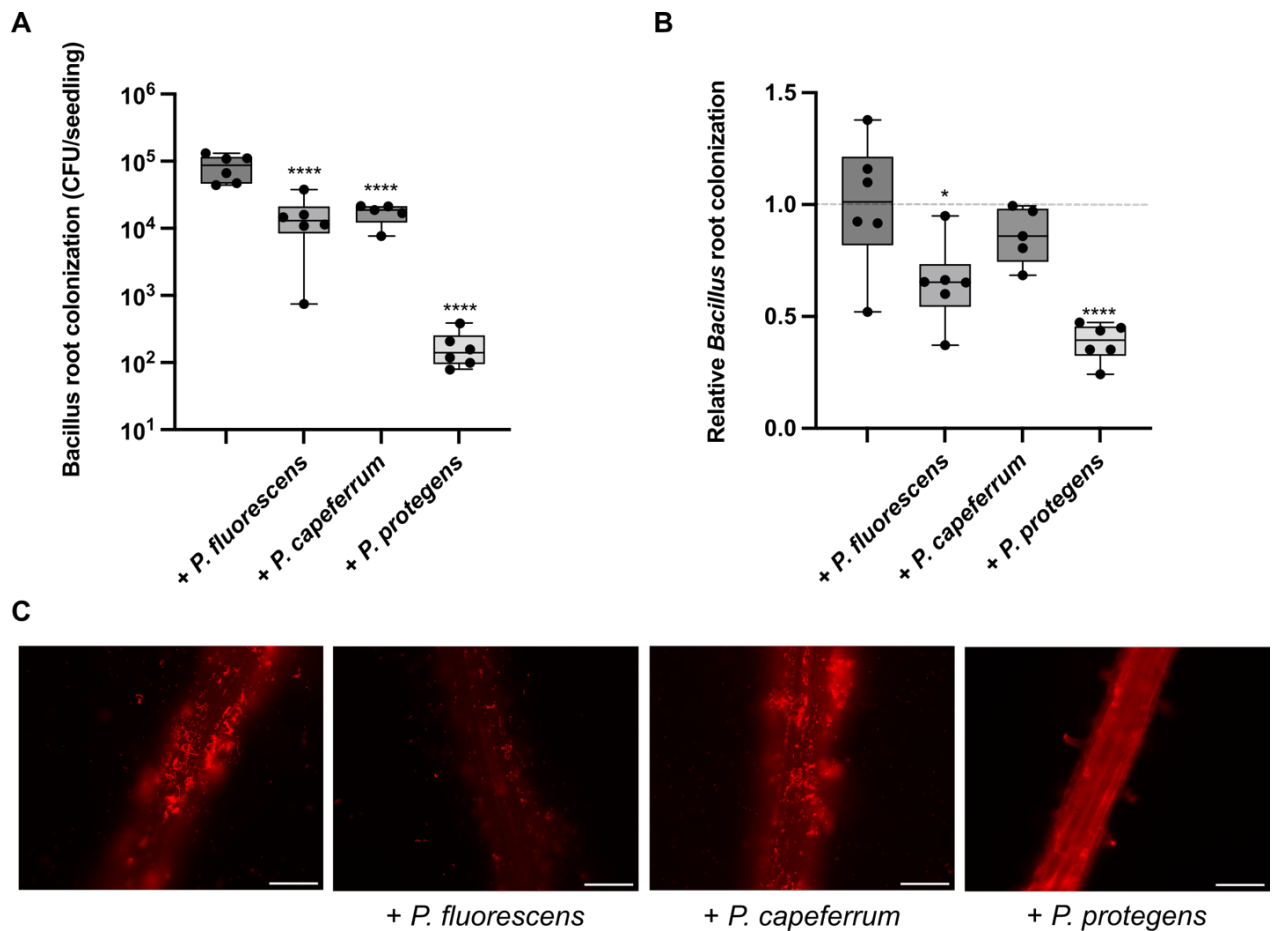
We thank members of Beauregard laboratory and Rodrigue laboratory for helpful discussions. We also thank Daniel Garneau for technical advice and processing of images. We thank Julie Beaudin for critical reading of the manuscript. This work was supported by NSERC discovery grant RGPIN-2020-07057 to P.B.B.

**Table A1. SNPs identified in the genomes of isolates evolved alone (BRE) on tomato roots.**

Evolution alone					Gene	Mutation	
Evolved isolates							
A1a.C7	A2.a.C14	A3.a.C7	A4.d.C7	A6.a.C7			
X			X		<i>ywcC</i>	214_215delAA 250G>T 11delA	frameshift variant stop gained frameshift variant
	X				<i>sinR</i>	125C>T 296T>C	missense variant missense variant
		X			<i>mccA</i>	632G>T	missense variant

**Table A2. SNPs identified in the genomes of isolates evolved with *P. fluorescens* (BRPE) on tomato roots.**

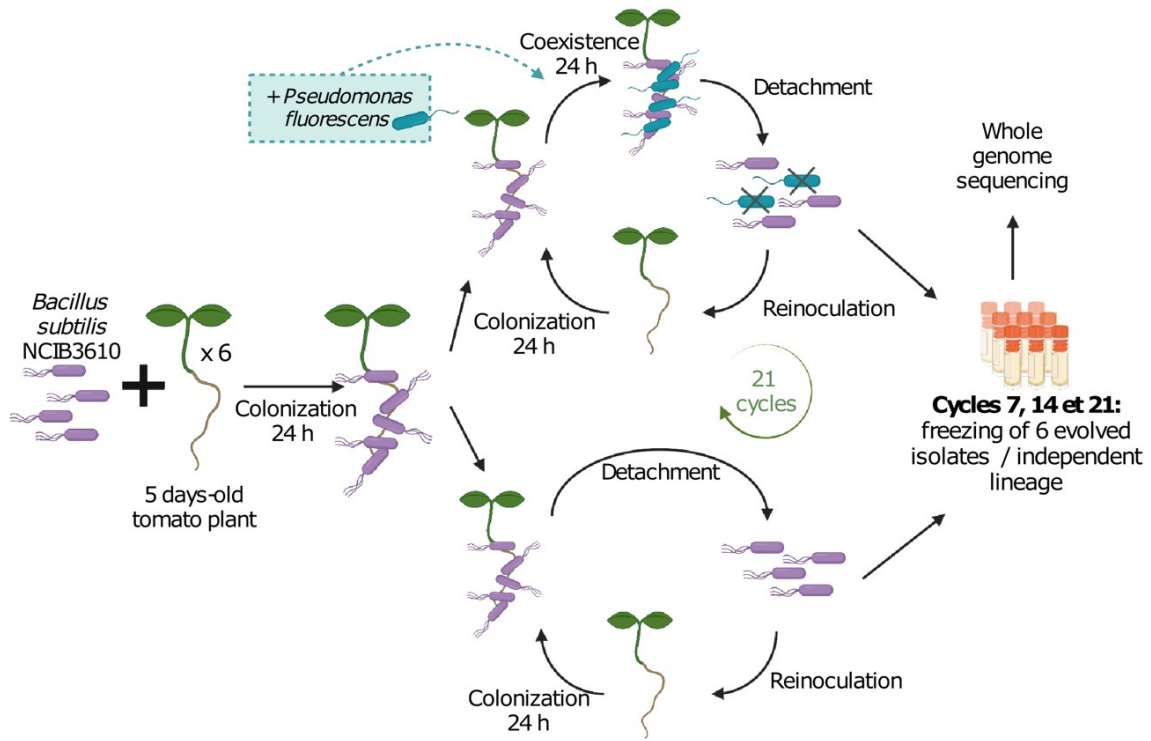
Evolution with <i>P. fluorescens</i>								
Evolved isolates						Gene	Mutation	
P3.a.C7	P3.a.C14	P4.a.C7	P4.b.C14	P5.a.C14	P5.d.C21			
X	X		X			<i>ywcC</i>	11delA frameshift variant	
	X					<i>sinR</i>	296T>C missense variant	
				X	X		170C>T missense variant	
					X	<i>dxs</i>	1246G>T missense variant	
	X					<i>dxr</i>	386C>T missense variant	
		X	X			<i>pksR</i>	5041T>C missense variant	



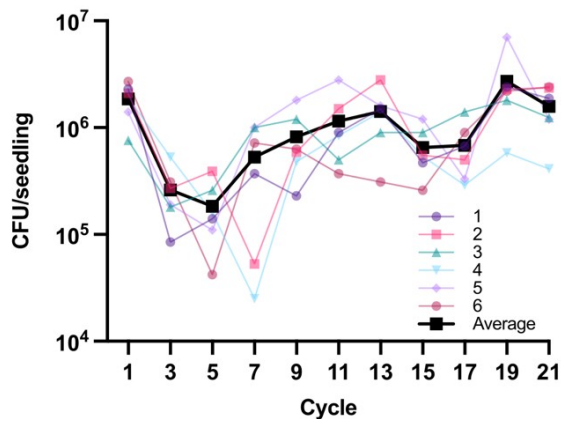
**Figure A1. *B. subtilis* colonization is decreased by *Pseudomonas* species.**

(A) Quantification of *B. subtilis* colonization on 6 days-old *A. thaliana* roots when inoculated alone or with different *Pseudomonas*. (B) Relative quantification of tomato root colonization by *B. subtilis* NCIB 3610 constitutively expressing mKATE2 and inoculated with *Pseudomonas* spp., reported as a ratio over the mean fluorescence intensity of *B. subtilis* colonizing the plant alone \* =  $P < 0.05$ , \*\*\*\* =  $P < 0.0001$ , ANOVA followed by Dunnett's post hoc test. (C) Representative pictures of *A. thaliana* root colonization when *B. subtilis* is inoculated alone or with different *Pseudomonas*. Scale bar is 100  $\mu\text{m}$  for all images.

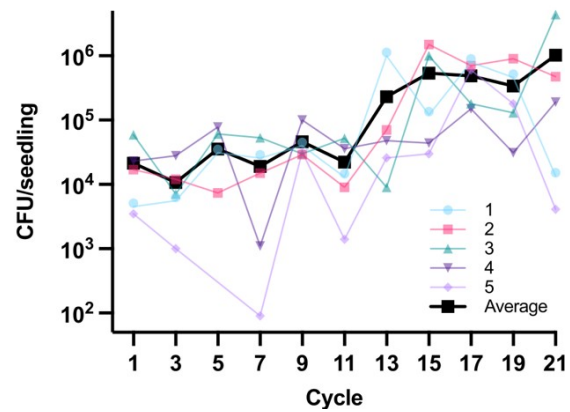
A



B



C

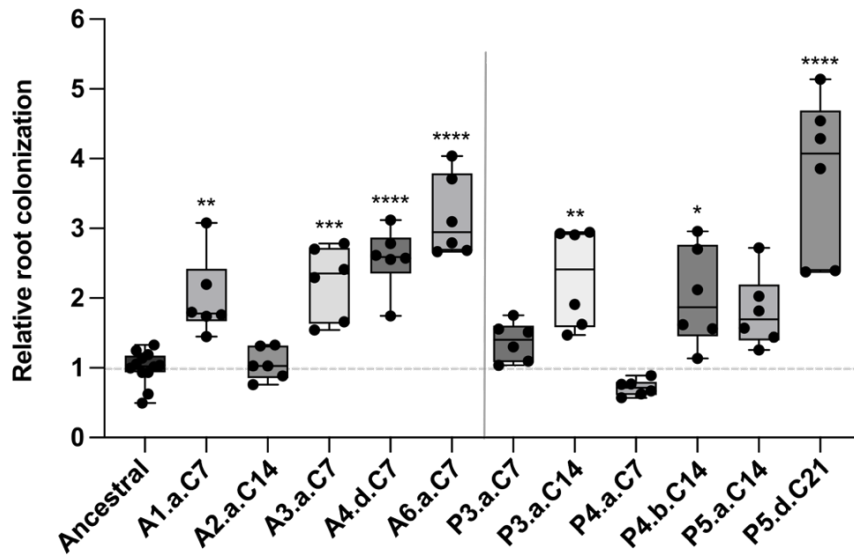


**Figure A2. Evolution of *B. subtilis* on tomato roots.**

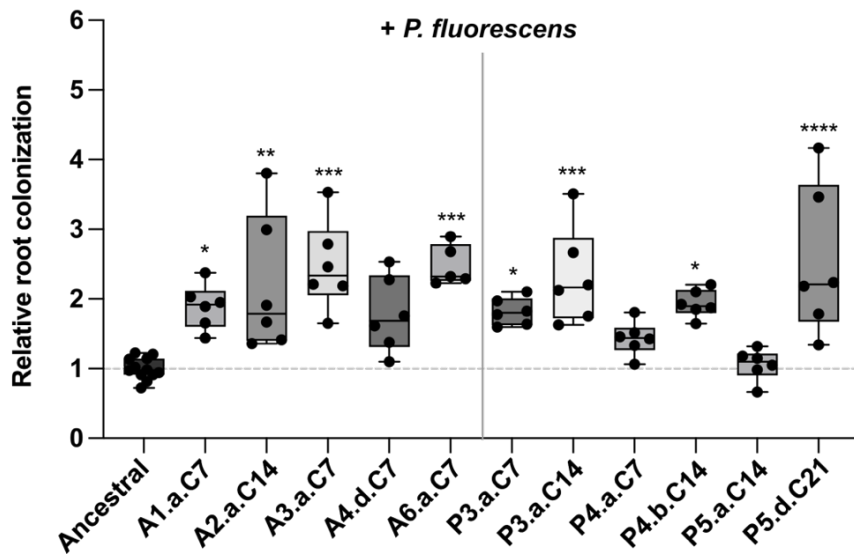
(A) Depiction of the directed evolution of *B. subtilis* in presence of *P. fluorescens* WCS365 or alone on tomato plant roots. (See *Methods* for detailed description of experiment). (B) CFU of *B. subtilis* colonizing the root at every two cycles for

the experimental evolution alone or (C) with *P. fluorescens*. Fig 2A was created with BioRender.com.

**A**



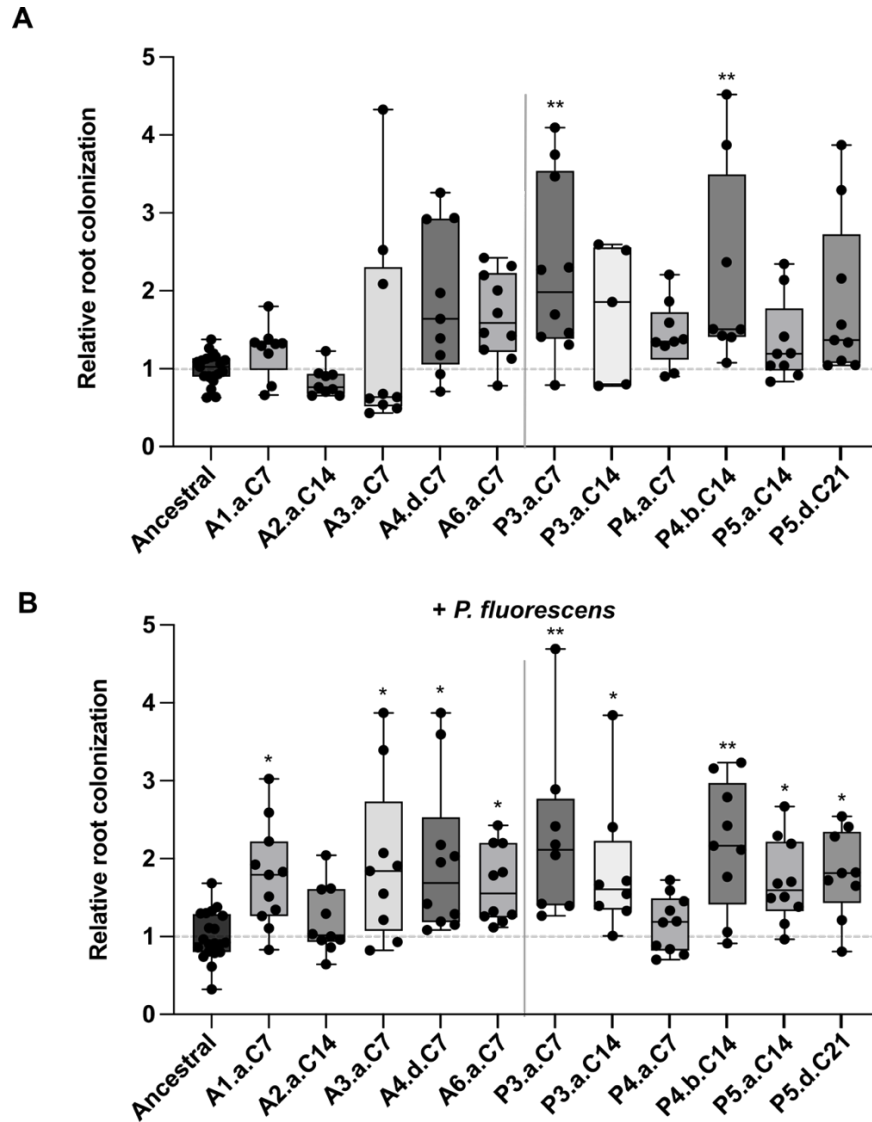
**B**



**Figure A3. Tomato root colonization by evolved isolates.**

Tomato root colonization by evolved isolates from the evolution alone (starts with A) and the evolution with *Pseudomonas* (starts with P) without (A) or with *P. fluorescens* WCS365 (B). 5-6 days-old tomato plants were inoculated with

ancestral strain or evolved isolates constitutively expressing mKATE2 and incubated for 24 h in a growth chamber. Bacteria were detached and quantified by fluorescence intensity for each plant. Relative root colonization was calculated by dividing the fluorescence intensity of each plant on the average intensity for the ancestral strain of the same experiment. Asterisks indicate statistically significant differences compared to ancestral strain, \* =  $P < 0.05$ , \*\* =  $P < 0.01$ , \*\*\* =  $P < 0.001$ , \*\*\*\* =  $P < 0.0001$ , ANOVA followed by Dunnett's post hoc test.

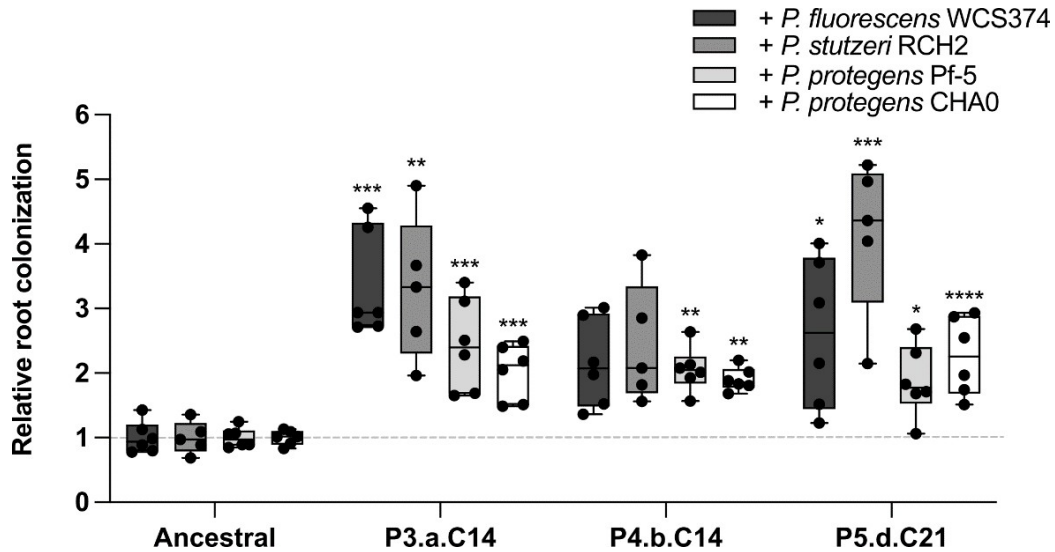


**Figure A4. *A. thaliana* root colonization by evolved isolates.**

*A. thaliana* root colonization by evolved isolates from the BRE (starts with A) and the BRPE (starts with P), without (top panel; A) or with *P. fluorescens* WCS365 (bottom panel; B). 6 days-old plants were inoculated with ancestral strain or evolved isolates constitutively expressing mKATE2 (with or without *P. fluorescens*) and incubated for 24 h in a growth chamber. Whole root pictures were taken using Zeiss Axio Observer Z1 microscope, root area was delimited, and relative root colonization was calculated by dividing the mean fluorescence

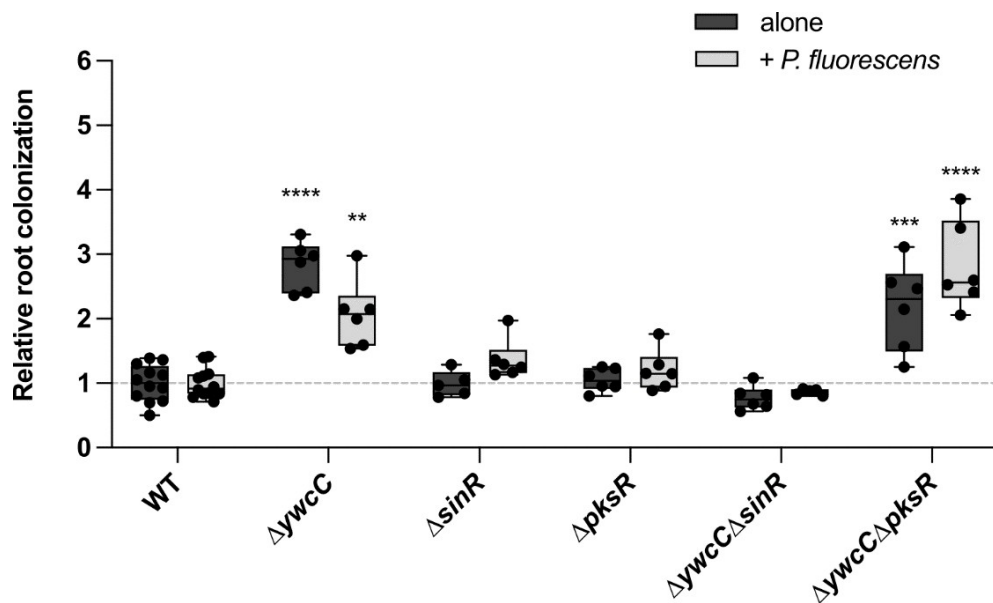


intensity by pixel of each root on the average intensity for the ancestral strain of the same experiment. Asterisks indicate statistically significant differences compared to ancestral strain, \* =  $P < 0.05$ , \*\* =  $P < 0.01$ , Kruskal-Wallis followed by Dunn's test.



**Figure A5. Mutations in biofilm regulators confer fitness toward various *Pseudomonas* spp.**

Root colonization in presence of other *Pseudomonas* spp. Tomato plants were inoculated as previously described, with mKATE2 expressing ancestral strain or evolved isolates, and four *Pseudomonas* species. \* =  $P < 0.05$ , \*\* =  $P < 0.01$ , \*\*\* =  $P < 0.001$ , \*\*\*\* =  $P < 0.0001$ , ANOVA followed by Dunnett's post hoc test (except in 5A for + *P. fluorescens* WCS374 and + *P. stutzeri* RCH2: Kruskal-Wallis followed by Dunn's test).



**Figure A6. Deletion of biofilm regulator gene *ywcC* improve tomato root colonization.**

Relative colonization of tomato roots by deletion mutants of genes of interest in the study, done as described earlier. Relative root colonization was calculated by dividing the fluorescence intensity of each plant on the average intensity for the ancestral strain of the same experiment. \* =  $P < 0.05$ , \*\* =  $P < 0.01$ , \*\*\* =  $P < 0.001$ , \*\*\*\* =  $P < 0.0001$ , ANOVA followed by Dunnett's post hoc test.

#### A.2.6 References

1. Trivedi P, Leach JE, Tringe SG, Sa T, Singh BK. Plant–microbiome interactions: from community assembly to plant health. *Nat Rev Microbiol*. 2020;18(11):607–21.
2. Pieterse CMJ, Zamioudis C, Berendsen RL, Weller DM, Van Wees SCM, Bakker PAHM. Induced systemic resistance by beneficial microbes. *Annu Rev Phytopathol*. 2014;52:347–75.
3. Kloepper JW, Schroth M. Plant Growth-Promoting Rhizobacteria and Plant Growth Under Gnotobiotic Conditions. *Phytopathology*. 1981;71(6):642–4.
4. Arnaouteli S, Bamford NC, Stanley-Wall NR, Kovács ÁT. *Bacillus subtilis* biofilm formation and social interactions. *Nat Rev Microbiol*. 2021;19(9):600–14.
5. Vejan P, Abdullah R, Khadiran T, Ismail S, Nasrulhaq Boyce A. Role of plant growth promoting rhizobacteria in agricultural sustainability-A review. *Molecules*. 2016;21(5):573.
6. Blake C, Christensen MN, Kovács ÁT. Molecular Aspects of Plant Growth Promotion and Protection by *Bacillus subtilis*. *Mol Plant-Microbe Interact*. 2020;34(1):MPMI-08-20- 0225.
7. Steinke K, Mohite OS, Weber T, Kovács ÁT. Phylogenetic Distribution of Secondary Metabolites in the *Bacillus subtilis* Species Complex. *mSystems*. 2021;6(2).
8. Arkhipova TN, Veselov SU, Melentiev AI, Martynenko E V., Kudoyarova GR. Ability of bacterium *Bacillus subtilis* to produce cytokinins and to influence the growth and endogenous hormone content of lettuce plants. *Plant Soil*. 2005 May;272(1–2):201–9.
9. Saeid A, Prochownik E, Dobrowolska-Iwanek J. Phosphorus solubilization by *Bacillus* species. *Molecules*. 2018;23(11):1–18.
10. Bais HP, Fall R, Vivanco JM. Biocontrol of *Bacillus subtilis* against Infection of *Arabidopsis* Roots by *Pseudomonas syringae* Is Facilitated by Biofilm Formation and Surfactin Production. *Plant Physiol*. 2004;134(1):307–19.
11. Kiesewalter HT, Lozano-Andrade CN, Wibowo M, Strube ML, Maróti G, Snyder D, et al. Genomic and Chemical Diversity of *Bacillus subtilis* Secondary Metabolites against Plant Pathogenic Fungi. *mSystems*. 2021;6(1).

12. Fan B, Blom J, Klenk HP, Borriss R. *Bacillus amyloliquefaciens*, *Bacillus velezensis*, and *Bacillus siamensis* Form an “Operational Group *B. amyloliquefaciens*” within the *B. subtilis* species complex. *Front Microbiol.* 2017;8(JAN):1–15.
13. Peng G, Mcgregor L, Lahlali R, Gossen BD, Hwang SF, Adhikari KK, et al. Potential biological control of clubroot on canola and crucifer vegetable crops. *Plant Pathol.* 2011;60(3):566–74.
14. Bardin M, Ajouz S, Comby M, Lopez-Ferber M, Graillot B, Siegwart M, et al. Is the efficacy of biological control against plant diseases likely to be more durable than that of chemical pesticides? *Front Plant Sci.* 2015;6(JULY):1–14.
15. Moreira RR, May De Mio LL. Potential biological agents isolated from apple fail to control *Glomerella* leaf spot in the field. *Biol Control.* 2015;87:56–63.
16. Wei F, Hu X, Xu X. Dispersal of *Bacillus subtilis* and its effect on strawberry phyllosphere microbiota under open field and protection conditions. *Sci Rep.* 2016;6(March):1–9.
17. O’Callaghan M, Ballard RA, Wright D. Soil microbial inoculants for sustainable agriculture: Limitations and opportunities. *Soil Use Manag.* 2022;38(3):1340–69.
18. Poppeliers SW, Sánchez-Gil JJ, de Jonge R. Microbes to support plant health: understanding bioinoculant success in complex conditions. *Curr Opin Microbiol.* 2023;73:102286.
19. Charron-Lamoureux V, Beauregard PB. *Arabidopsis thaliana* seedlings influence *Bacillus subtilis* spore formation. *Mol Plant-Microbe Interact.* 2019;32(9):1188–95.
20. Charron-Lamoureux V, Thérien M, Konk A, Beauregard PB. *Bacillus subtilis* and *Bacillus velezensis* population dynamics and quantification of spores after inoculation on ornamental plants. *Can J Microbiol.* 2020;66(11):664–9.
21. Powers MJ, Sanabria-Valentín E, Bowers AA, Shank EA. Inhibition of cell differentiation in *Bacillus subtilis* by *Pseudomonas protegens*. *J Bacteriol.* 2015;197(13):2129–38.
22. Lyng M, Kovács ÁT. Frenemies of the soil: *Bacillus* and *Pseudomonas* interspecies interactions. *Trends Microbiol.* 2023;xx(xx):1–13.

23. Beauregard PB, Chai Y, Vlamakis H, Losick R, Kolter R. *Bacillus subtilis* biofilm induction by plant polysaccharides. Proc Natl Acad Sci U S A. 2013 Apr 23;110(17).
24. Chen Y, Yan F, Chai Y, Liu H, Kolter R, Losick R, et al. Biocontrol of tomato wilt disease by *Bacillus subtilis* isolates from natural environments depends on conserved genes mediating biofilm formation. Environ Microbiol. 2013;15(3):848–64.
25. Vlamakis H, Chai Y, Beauregard P, Losick R, Kolter R. Sticking together: Building a biofilm the *Bacillus subtilis* way. Nat Rev Microbiol. 2013;11(3):157–68.
26. Yu Y, Yan F, Chen Y, Jin C, Guo JH, Chai Y. Poly- $\gamma$ -glutamic acids contribute to biofilm formation and plant root colonization in selected environmental isolates of *Bacillus subtilis*. Front Microbiol. 2016;7(NOV):1–15.
27. Chen Y, Cao S, Chai Y, Clardy J, Kolter R, Guo JH and Losick R. A *Bacillus subtilis* sensor kinase involved in triggering biofilm formation on the roots of tomato plants. Mol Microbiol. 2012;85(3):418–30.
28. Kawecki TJ, Lenski RE, Ebert D, Hollis B, Olivieri I, Whitlock MC. Experimental evolution. Trends Ecol Evol. 2012;27(10):547–60.
29. Batstone RT, O'Brien AM, Harrison TL, Frederickson ME. Experimental evolution makes microbes more cooperative with their local host genotype. Science. 2020;370(6515):23–6.
30. Nordgaard M, Blake C, Maróti G, Hu G, Wang Y, Strube ML, et al. Experimental evolution of *Bacillus subtilis* on *Arabidopsis thaliana* roots reveals fast adaptation and improved root colonization. iScience. 2022;25(6).
31. Blake C, Nordgaard M, Maróti G, Kovács ÁT. Diversification of *Bacillus subtilis* during experimental evolution on *Arabidopsis thaliana* and the complementarity in root colonization of evolved subpopulations. Environ Microbiol. 2021;23(10):6122–36.
32. Hu G, Wang Y, Blake C, Nordgaard M, Liu X. Parallel genetic adaptation of *Bacillus subtilis* to different plant species. 2023; bioRxiv
33. Compant S, Clément C, Sessitsch A. Plant growth-promoting bacteria in the rhizo- and endosphere of plants: Their role, colonization, mechanisms involved and prospects for utilization. Soil Biol Biochem. 2010;42(5):669–78.

34. Comeau D, Balthazar C, Novinscak A, Bouhamdani N, Joly DL, Filion M. Interactions Between *Bacillus* Spp., *Pseudomonas* spp. and *Cannabis sativa* Promote Plant Growth. *Front Microbiol.* 2021;12(September).
35. Islam S, Akanda AM, Prova A, Islam MT, Hossain MM. Isolation and Identification of Plant Growth Promoting Rhizobacteria from Cucumber Rhizosphere and Their Effect on Plant Growth Promotion and Disease Suppression. *Front Microbiol.* 2016;6(February):1–12.
36. Simões M, Simoes LC, Pereira MO, Vieira MJ. Antagonism between *Bacillus cereus* and *Pseudomonas fluorescens* in planktonic systems and in biofilms. *Biofouling.* 2008;24(5):339–49.
37. Andrić S, Meyer T, Rigolet A, Prigent-Combaret C, Höfte M, Balleux G, et al. Lipopeptide Interplay Mediates Molecular Interactions between Soil *Bacilli* and *Pseudomonads*. *Microbiol Spectr.* 2021;9(3).
38. Molina-Santiago C, Vela-Corcía D, Petras D, Díaz-Martínez L, Pérez-Lorente AI, Sopeña-Torres S, et al. Chemical interplay and complementary adaptative strategies toggle bacterial antagonism and co-existence. *Cell Rep.* 2021;36(4).
39. Rojas-Ruiz NE, Sansinenea-Royano E, Cedillo-Ramirez ML, Marsch-Moreno R, Sanchez-Alonso P, Vazquez-Cruz C. Analysis of *Bacillus thuringiensis* population dynamics and its interaction with *Pseudomonas fluorescens* in soil. *Jundishapur J Microbiol.* 2015;8(9).
40. Vasileva-Tonkova E, Sotirova A, Galabova D. The effect of rhamnolipid biosurfactant produced by *Pseudomonas fluorescens* on model bacterial strains and isolates from industrial wastewater. *Curr Microbiol.* 2011;62(2):427–33.
41. De Rienzo MAD, Martin PJ. Effect of Mono and Di-rhamnolipids on Biofilms Preformed by *Bacillus subtilis* BBK006. *Curr Microbiol.* 2016;73(2):183–9.
42. Andrić S, Meyer T, Ongena M. *Bacillus* Responses to Plant-Associated Fungal and Bacterial Communities. *Front Microbiol.* 2020;11(June):1–9.
43. Geels FP, Schippers B. Reduction of Yield Depressions in High Frequency Potato Cropping Soil after Seed Tuber Treatments with Antagonistic Fluorescent *Pseudomonas* spp. *J Phytopathol.* 1983;108(3–4):207–14.
44. Howell CR, Stipanovic RD. Control of *Rhizoctonia solani* on cotton seedlings with *Pseudomonas fluorescens* and with an antibiotic produced by the bacterium by the soil tube method described previously. *Phytopathology.* 1979;69(5):480–2.

45. Melnyk RA, Hossain SS, Haney CH. Convergent gain and loss of genomic islands drive lifestyle changes in plant-associated *Pseudomonas*. ISME. 2019;13(6):1575–88. Available
46. Liu Z, Beskrovnaya P, Melnyk RA, Hossain SS, Khorasani S, O'sullivan LR, et al. A genome- wide screen identifies genes in rhizosphere-associated *pseudomonas* required to evade plant defenses. MBio. 2018;9(6):1–17.
47. Loper JE, Kobayashi DY, Paulsen IT. The genomic sequence of *Pseudomonas fluorescens* Pf-5: Insights into biological control. Phytopathology. 2007;97(2):233–8.
48. Kobayashi K. SlrR/SlrA controls the initiation of biofilm formation in *Bacillus subtilis*. Mol Microbiol. 2008;69(6):1399–410.
49. Kearns DB, Chu F, Branda SS, Kolter R, Losick R. A master regulator for biofilm formation by *Bacillus subtilis*. Mol Microbiol. 2005;55(3):739–49.
50. Chai Y, Kolter R, Losick R. Paralogous antirepressors acting on the master regulator for biofilm formation in *Bacillus subtilis*. Mol Microbiol. 2009;74(4):876–87.
51. Newman JA, Rodrigues C, Lewis RJ. Molecular basis of the activity of SinR Protein, the master regulator of biofilm formation in *Bacillus subtilis*. J Biol Chem. 2013;288(15):10766–78.
52. Milton ME, Draughn GL, Bobay BG, Stowe SD, Olson AL, Feldmann EA, et al. The Solution Structures and Interaction of SinR and SinI: Elucidating the Mechanism of Action of the Master Regulator Switch for Biofilm Formation in *Bacillus subtilis*. J Mol Biol. 2020;432(2):343–57.
53. Patel PS, Huang S, Fisher S, Pirnik D, Aklonis C, Dean L, et al. Bacillaene, a novel inhibitor of procaryotic protein synthesis produced by *Bacillus subtilis*: production, taxonomy, isolation, physico-chemical characterization and biological activity. J Antibiot (Tokyo). 1995;48(9):997–1003. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7592068>
54. Yasbin RE, Young FE. Transduction in *Bacillus subtilis* by Bacteriophage SPP1. J Virol. 1974;14(6):1343–8.
55. Bourgey M, Dali R, Eveleigh R, Chen KC, Letourneau L, Fillon J, et al. GenPipes: An open- source framework for distributed and scalable genomic analyses. Gigascience. 2019;8(6):1–11.

56. Chen S, Zhou Y, Chen Y, Gu J. Fastp: An ultra-fast all-in-one FASTQ preprocessor. *Bioinformatics*. 2018;34(17):i884–90.
57. Li H. Aligning sequence reads, clone sequences and assembly contigs with BWA-MEM. 2013;[q-bio.GN].
58. McKenna A, Hanna M, Banks E, Sivachenko A, Cibulskis K, Kernytzky A, et al. The Genome Analysis Toolkit: A MapReduce framework for analyzing next-generation DNA sequencing data. *Genome Res*. 2010;20:1297–1303.
59. Cingolani P, Platts A, Wang LL, Coon M, Nguyen T, Wang L, et al. A program for annotating and predicting the effects of single nucleotide polymorphisms, SnpEff: SNPs in the genome of *Drosophila melanogaster* strain w1118; iso-2; iso-3. *Fly (Austin)*. 2012;6(2):80–92.

#### A.2.7 Supplementary data

**Table SA1. Mutations identified in the genome of isolates from the BRE on tomato roots.**

Gene	Mutation		Lineage 1			Lineage 2						Lineage 3			Lineage 4				Lineage 5			Lineage 6				
			1.a.C7	1.a.C14	1.a.C21	2.a.C7	2.a.C14	2.b.C14	2.c.C14	2.a.C14	2.a.C21	2.b.C21	3.a.C7	3.a.C14	3.a.C21	4.a.C7	4.d.C7	4.a.C14	4.a.C21	5.a.C7	5.a.C14	5.a.C21	6.a.C7	6.a.C14	6.a.C21	
tpk	c.241G>T	missense_variant											X													
BAUR2_22510	c.523_31del	stop_lost&inframe_deletion&splice_region_variant											X													
stfAC	c.338C>A	missense_variant																								
yioN	c.157C>T	missense_variant						X																		
codY-figB	n.1691261C>T	intergenic_region																								
yodI	c.104G>C	missense_variant						X																		
sinI-sinR	n.2552687G>A	intergenic_region																								
sinR	c.29C>T	missense_variant																	X	X	X					
	c.125C>T	missense_variant					X		X			X														
	c.298T>C	missense_variant										X	X	X	X											
	c.311G>T	missense_variant				X		X		X	X															
mccA	c.632G>T	missense_variant											X													
sdpA	c.77delA	frameshift_variant																								
epsC	c.1289T>G	missense_variant																								
p8A	c.448G>T	stop_gained							X																	
ywcC	c.250G>T	stop_gained													X	X										
	c.214_215delAA	frameshift_variant	X	X	X																					
	c.215delA	frameshift_variant															X									
	c.11delA	frameshift_variant																					X	X	X	
aldX	c.921_967delTCGAAAGAGGGGGGGAAGTGGTGTGGGGGGCGATTATCGATGCCA	disruptive_inframe_deletion														X										

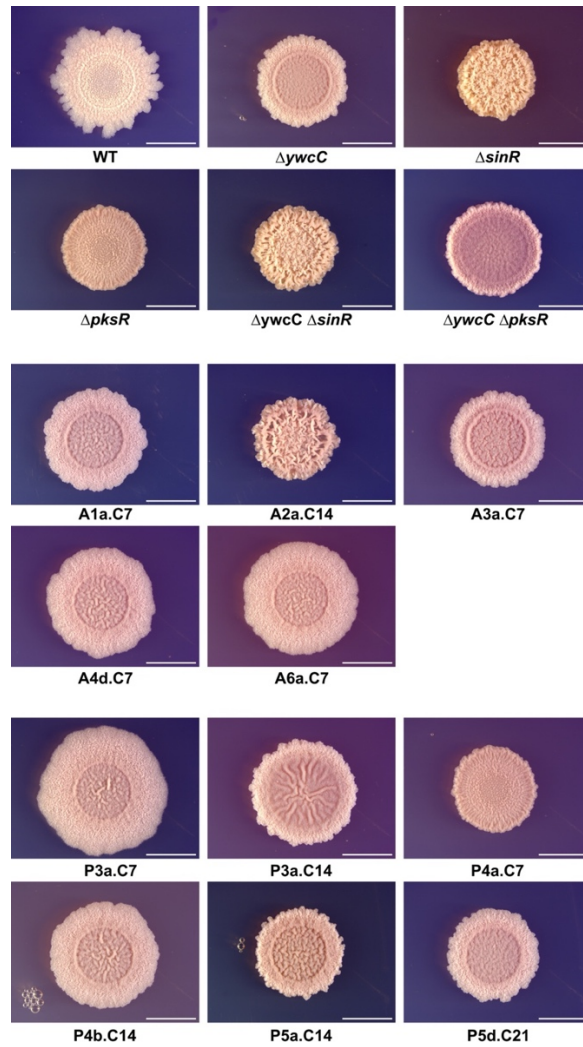




**Table SA3. Strains used in this study.**

Strain	Genotype	Reference
NCIB 3610	WT/undomesticated	Lab stock
PB389	3610 <i>amyE</i> ::P <sub>hyperspank</sub> -mKATE2	Lab stock
PB127	3610 <i>ywcC</i> ::kan	YC295 <sup>1</sup>
MP57	3610 <i>ywcC</i> ::kan <i>amyE</i> ::P <sub>hyperspank</sub> -mKATE2	This study
PB18	3610 <i>sinR</i> ::spc	Lab stock
MP63	3610 <i>sinR</i> ::spc <i>amyE</i> ::P <sub>hyperspank</sub> -mKATE2	This study
BKK17220	168 <i>pksR</i> ::kan	BGSC <sup>2</sup>
MP65	3610 <i>pksR</i> ::kan	This study
MP66	3610 <i>pksR</i> ::kan <i>amyE</i> ::P <sub>hyperspank</sub> -mKATE2	This study
BKE17220	168 <i>pksR</i> ::erm	BGSC <sup>2</sup>
MP67	3610 <i>ywcC</i> ::kan <i>pksR</i> ::erm <i>amyE</i> ::P <sub>hyperspank</sub> -mKATE2	This study
MP60	3610 <i>ywcC</i> ::kan <i>sinR</i> ::spc	This study
MP68	3610 <i>ywcC</i> ::kan <i>sinR</i> ::spc <i>amyE</i> ::P <sub>hyperspank</sub> -mKATE2	This study
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	WCS365	Lab stock
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	WCS374	Cara Haney
<i>Pseudomonas capeferrum</i>	WCS358	Lab stock
<i>Pseudomonas protegens</i>	Pf-5	Lab stock
<i>Pseudomonas protegens</i>	CHA0	Cara Haney
<i>Pseudomonas stutzeri</i>	RCH2	Cara Haney

Antibiotics resistance abbreviations: Kanamycin (kan), spectinomycin (spc), erythromycin (erm)



**Figure SA1. Morphotypes of deletion mutants and evolved isolates**

Representative pictures of colony morphotypes of deletion mutants or evolved isolates grown on MS agar + 0.5% glutamate + 0.5% glycerol for 48 h. Scale bar is 5 mm for all images.



## BIBLIOGRAPHIE

- Abdul-Tehrani, H., Hudson, A. J., Chang, Y.-S., Timms, A. R., Hawkins, C., Williams, J. M., Harrison, P. M., Guest, J. R., et Andrews, S. C. (1999). Ferritin Mutants of *Escherichia coli* Are Iron Deficient and Growth Impaired, and *fur* Mutants are Iron Deficient. *Journal of Bacteriology*, 181(5), 1415–1428. <https://doi.org/10.1128/jb.181.5.1415-1428.1999>
- Aguirre, J. D., et Culotta, V. C. (2012). Battles with Iron: Manganese in Oxidative Stress Protection. *Journal of Biological Chemistry*, 287(17), 13541–13548. <https://doi.org/10.1074/jbc.R111.312181>
- Ahmed, E., et Holmström, S. J. M. (2014). Siderophores in environmental research: Roles and applications. *Microbial Biotechnology*, 7(3), 196–208. <https://doi.org/10.1111/1751-7915.12117>
- Alam, K., Islam, Md. M., Li, C., Sultana, S., Zhong, L., Shen, Q., Yu, G., Hao, J., Zhang, Y., Li, R., et Li, A. (2021). Genome Mining of *Pseudomonas* Species: Diversity and Evolution of Metabolic and Biosynthetic Potential. *Molecules*, 26(24). <https://doi.org/10.3390/molecules26247524>
- Allard-Massicotte, R., Tessier, L., Lécuyer, F., Lakshmanan, V., Lucier, J.-F., Garneau, D., Caudwell, L., Vlamakis, H., Bais, H. P., et Beauregard, P. B. (2016). *Bacillus subtilis* Early Colonization of *Arabidopsis thaliana* Roots Involves Multiple Chemotaxis Receptors. *MBio*, 7(6), 10.1128/mbio.01664-16. <https://doi.org/10.1128/mbio.01664-16>
- Andrews, S. C., Robinson, A. K., et Rodríguez-Quiñones, F. (2003). Bacterial iron homeostasis. *FEMS Microbiology Reviews*, 27(2–3), 215–237. [https://doi.org/10.1016/S0168-6445\(03\)00055-X](https://doi.org/10.1016/S0168-6445(03)00055-X)
- Andrić, S., Meyer, T., Rigolet, A., Prigent-Combaret, C., Höfte, M., Balleux, G., Steels, S., Hoff, G., De Mot, R., McCann, A., De Pauw, E., Argüelles Arias, A., et Ongena, M. (2021). Lipopeptide Interplay Mediates Molecular Interactions between Soil Bacilli and Pseudomonads. *Microbiology Spectrum*, 9(3), e02038-21. <https://doi.org/10.1128/spectrum.02038-21>

- Angelini, L., dos Santos, R. C., Fox, G., Paruthiyil, S., Gozzi, K., Shemesh, M., et Chai, Y. (2023). Pulcherrimin protects *Bacillus subtilis* against oxidative stress during biofilm development. <https://doi.org/10.21203/rs.3.rs-2505116/v1>
- Appleby, J. L., Parkinson, J. S., et Bourret, R. B. (1996). Signal Transduction via the Multi-Step Phosphorelay: Not Necessarily a Road Less Traveled. *Cell*, 86(6), 845–848. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)80158-0](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)80158-0)
- Arnaouteli, S., Bamford, N. C., Stanley-Wall, N. R., et Kovács, Á. T. (2021). *Bacillus subtilis* biofilm formation and social interactions. *Nature Reviews Microbiology*, 19(9), 600–614. <https://doi.org/10.1038/s41579-021-00540-9>
- Arnaouteli, S., Matoz-Fernandez, D. A., Porter, M., Kalamara, M., Abbott, J., MacPhee, C. E., Davidson, F. A., et Stanley-Wall, N. R. (2019). Pulcherrimin formation controls growth arrest of the *Bacillus subtilis* biofilm. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 116(27), 13553–13562. <https://doi.org/10.1073/pnas.1903982116>
- Backer, R., Rokem, J. S., Ilangumaran, G., Lamont, J., Praslickova, D., Ricci, E., Subramanian, S., et Smith, D. L. (2018). Plant Growth-Promoting Rhizobacteria: Context, Mechanisms of Action, and Roadmap to Commercialization of Biostimulants for Sustainable Agriculture. *Frontiers in Plant Science*, 9. <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fpls.2018.01473>
- Badri, D. V., & Vivanco, J. M. (2009). Regulation and function of root exudates. *Plant, Cell & Environment*, 32(6), 666–681. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3040.2009.01926.x>
- Bangera, M. G., et Thomashow, L. S. (1999). Identification and Characterization of a Gene Cluster for Synthesis of the Polyketide Antibiotic 2,4-Diacetylphloroglucinol from *Pseudomonas fluorescens* Q2-87. *Journal of Bacteriology*, 181(10), 3155–3163. <https://doi.org/10.1128/jb.181.10.3155-3163.1999>
- Barazani, O., et Friedman, J. (1999). Is IAA the Major Root Growth Factor Secreted from Plant-Growth-Mediating Bacteria? *Journal of Chemical Ecology*, 25(10), 2397–2406. <https://doi.org/10.1023/A:1020890311499>
- Barb, W. G., Baxendale, J. H., George, P., et Hargrave, K. R. (1949). Reactions of Ferrous and Ferric Ions with Hydrogen Peroxide. *Nature*, 163(4148), 692–694. <https://doi.org/10.1038/163692a0>

- Bashir, I., War, A. F., Rafiq, I., Reshi, Z. A., Rashid, I., et Shouche, Y. S. (2022). Phyllosphere microbiome: Diversity and functions. *Microbiological Research*, 254, 126888. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2021.126888>
- Beauregard, P. B., Chai, Y., Vlamakis, H., Losick, R., et Kolter, R. (2013). *Bacillus subtilis* biofilm induction by plant polysaccharides. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 110(17), E1621–E1630. <https://doi.org/10.1073/pnas.1218984110>
- Behnsen, J., Zhi, H., Aron, A. T., Subramanian, V., Santus, W., Lee, M. H., Gerner, R. R., Petras, D., Liu, J. Z., Green, K. D., Price, S. L., Camacho, J., Hillman, H., Tjokrosurjo, J., Montaldo, N. P., Hoover, E. M., Treacy-Abarca, S., Gilston, B. A., Skaar, E. P., ... Raffatellu, M. (2021). Siderophore-mediated zinc acquisition enhances enterobacterial colonization of the inflamed gut. *Nature Communications*, 12(1), 7016. <https://doi.org/10.1038/s41467-021-27297-2>
- Beinert, H., Holm, R. H., et Münck, E. (1997). Iron-Sulfur Clusters: Nature's Modular, Multipurpose Structures. *Science*, 277(5326), 653–659. <https://doi.org/10.1126/science.277.5326.653>
- Berendsen, R. L., van Verk, M. C., Stringlis, I. A., Zamioudis, C., Tommassen, J., Pieterse, C. M. J., & Bakker, P. A. H. M. (2015). Unearthing the genomes of plant-beneficial *Pseudomonas* model strains WCS358, WCS374 and WCS417. *BMC Genomics*, 16(1), 539. <https://doi.org/10.1186/s12864-015-1632-z>
- Bhattacharyya, P. N., et Jha, D. K. (2012). Plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR): Emergence in agriculture. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 28(4), 1327–1350. <https://doi.org/10.1007/s11274-011-0979-9>
- Bird, L. J., Bonnefoy, V., et Newman, D. K. (2011). Bioenergetic challenges of microbial iron metabolisms. *Trends in Microbiology*, 19(7), 330–340. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2011.05.001>
- Blumer, C., et Haas, D. (2000). Mechanism, regulation, and ecological role of bacterial cyanide biosynthesis. *Archives of Microbiology*, 173(3), 170–177. <https://doi.org/10.1007/s002039900127>
- Bourassa, J.-S., Jeannotte, G., Lebel-Beaucage, S., et Beauregard, P. B. (2022). Second-Generation Transfer Mediates Efficient Propagation of ICEBs1 in Biofilms. *Journal of Bacteriology*, 204(10), e00181-22. <https://doi.org/10.1128/jb.00181-22>

- Braud, A., Hannauer, M., Mislin, G. L. A., et Schalk, I. J. (2009). The *Pseudomonas aeruginosa* Pyochelin-Iron Uptake Pathway and Its Metal Specificity. *Journal of Bacteriology*, 191(11), 3517–3525. <https://doi.org/10.1128/jb.00010-09>
- Brazelton, J. N., Pfeufer, E. E., Sweat, T. A., Gardener, B. B. M., et Coenen, C. (2008). 2,4-Diacetylphloroglucinol Alters Plant Root Development. *Molecular Plant-Microbe Interactions*®, 21(10), 1349–1358. <https://doi.org/10.1094/MPMI-21-10-1349>
- Brencic, A., McFarland, K. A., McManus, H. R., Castang, S., Mogno, I., Dove, S. L., et Lory, S. (2009). The GacS/GacA signal transduction system of *Pseudomonas aeruginosa* acts exclusively through its control over the transcription of the RsmY and RsmZ regulatory small RNAs. *Molecular Microbiology*, 73(3), 434–445. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2009.06782.x>
- Burris, R. H. (1974). Biological Nitrogen Fixation, 1924-1974. *Plant Physiology*, 54(4), 443–449. JSTOR.
- Canale-Parola, E. (1963). A red pigment produced by aerobic sporeforming bacteria. *Archiv Für Mikrobiologie*, 46(4), 414–427. <https://doi.org/10.1007/BF00408495>
- Canarini, A., Kaiser, C., Merchant, A., Richter, A., et Wanek, W. (2019). Root Exudation of Primary Metabolites: Mechanisms and Their Roles in Plant Responses to Environmental Stimuli. *Frontiers in Plant Science*, 10. <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fpls.2019.00157>
- Canfield, D. E., Ngombi-Pemba, L., Hammarlund, E. U., Bengtson, S., Chaussidon, M., Gauthier-Lafaye, F., Meunier, A., Riboulleau, A., Rollion-Bard, C., Rouxel, O., Asael, D., Pierson-Wickmann, A.-C., et El Albani, A. (2013). Oxygen dynamics in the aftermath of the Great Oxidation of Earth's atmosphere. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 110(42), 16736–16741. <https://doi.org/10.1073/pnas.1315570110>
- Carpita, N. C., et Gibeaut, D. M. (1993). Structural models of primary cell walls in flowering plants: Consistency of molecular structure with the physical properties of the walls during growth. *The Plant Journal*, 3(1), 1–30. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.1993.tb00007.x>
- Chae, D.-H., Kim, D.-R., Cheong, M. S., Lee, Y. B., et Kwak, Y.-S. (2020). Investigating the Induced Systemic Resistance Mechanism of 2,4-Diacetylphloroglucinol



(DAPG) using DAPG Hydrolase-Transgenic *Arabidopsis*. *The Plant Pathology Journal*, 36(3), 255–266. <https://doi.org/10.5423/PPJ.OA.02.2020.0031>

Chandrangsu, P., Rensing, C., et Helmann, J. D. (2017). Metal homeostasis and resistance in bacteria. *Nature Reviews Microbiology*, 15(6), 338–350. <https://doi.org/10.1038/nrmicro.2017.15>

Cheah, S.-F., Kraemer, S. M., Cervini-Silva, J., et Sposito, G. (2003). Steady-state dissolution kinetics of goethite in the presence of desferrioxamine B and oxalate ligands: Implications for the microbial acquisition of iron. *Chemical Geology*, 198(1), 63–75. [https://doi.org/10.1016/S0009-2541\(02\)00421-7](https://doi.org/10.1016/S0009-2541(02)00421-7)

Chen, Y., Cao, S., Chai, Y., Clardy, J., Kolter, R., Guo, J., et Losick, R. (2012). A *Bacillus subtilis* sensor kinase involved in triggering biofilm formation on the roots of tomato plants. *Molecular Microbiology*, 85(3), 418–430. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2012.08109.x>

Chen, Y., Gozzi, K., Yan, F., et Chai, Y. (2015). Acetic Acid Acts as a Volatile Signal To Stimulate Bacterial Biofilm Formation. *MBio*, 6(3), 10.1128/mbio.00392-15. <https://doi.org/10.1128/mbio.00392-15>

Chinchilla, D., Zipfel, C., Robatzek, S., Kemmerling, B., Nürnberger, T., Jones, J. D. G., Felix, G., et Boller, T. (2007). A flagellin-induced complex of the receptor FLS2 and BAK1 initiates plant defence. *Nature*, 448(7152), Article 7152. <https://doi.org/10.1038/nature05999>

Chirakkal, H., O'Rourke, M., Atrih, A., Foster, S. J., et Moir, A. (2002). Analysis of spore cortex lytic enzymes and related proteins in *Bacillus subtilis* endospore germination. *Microbiology*, 148(8), 2383–2392. <https://doi.org/10.1099/00221287-148-8-2383>

Chou, K.-T., Lee, D. D., Chiou, J., Galera-Laporta, L., Ly, S., Garcia-Ojalvo, J., et Süel, G. M. (2022). A segmentation clock patterns cellular differentiation in a bacterial biofilm. *Cell*, 185(1), 145-157.e13. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2021.12.001>

Compant, S., Samad, A., Faist, H., et Sessitsch, A. (2019). A review on the plant microbiome: Ecology, functions, and emerging trends in microbial application. *Special Issue on Plant Microbiome*, 19, 29–37. <https://doi.org/10.1016/j.jare.2019.03.004>

- Conde e Silva, N., Gonçalves, I. R., Lemaire, M., Lesuisse, E., Camadro, J. M., et Blaiseau, P. L. (2009). KIAft, the *Kluyveromyces lactis* Ortholog of Aft1 and Aft2, Mediates Activation of Iron-Responsive Transcription Through the PuCACCC Aft-Type Sequence. *Genetics*, 183(1), 93–106. <https://doi.org/10.1534/genetics.109.104364>
- Contreras, D., Rodríguez, J., Basaez, L., Freer, J., Valenzuela, R., Mansilla, H., et Vanýsek, P. (2011). New insights in the dihydroxybenzenes-driven Fenton reaction: Electrochemical study of interaction between dihydroxybenzenes and Fe(III). *Water Science and Technology*, 64(10), 2103–2108. <https://doi.org/10.2166/wst.2011.420>
- Coulthurst, S. (2019). The Type VI secretion system: A versatile bacterial weapon. In *Microbiology* (Vol. 165, Issue 5, pp. 503–515). Microbiology Society. <https://doi.org/10.1099/mic.0.000789>
- Cryle, M. J., Bell, S. G., et Schlichting, I. (2010). Structural and Biochemical Characterization of the Cytochrome P450 CypX (CYP134A1) from *Bacillus subtilis*: A Cyclo-L-leucyl-L-leucyl Dipeptide Oxidase. *Biochemistry*, 49(34), 7282–7296. <https://doi.org/10.1021/bi100910y>
- David Thoms, Melissa Y. Chen, Yang Liu, Zayda Morales Moreira, Youqing Luo, Siyu Song, Nicole R. Wang, et Cara H. Haney. (2023). Innate immunity can distinguish beneficial from pathogenic rhizosphere microbiota. *BioRxiv*, 2023.01.07.523123. <https://doi.org/10.1101/2023.01.07.523123>
- Delgado-Baquerizo, M. (2022). Simplifying the complexity of the soil microbiome to guide the development of next-generation SynComs. *Journal of Sustainable Agriculture and Environment*, 1(1), 9–15. <https://doi.org/10.1002/sae2.12012>
- Deng, Y., Chen, H., Li, C., Xu, J., Qi, Q., Xu, Y., Zhu, Y., Zheng, J., Peng, D., Ruan, L., et Sun, M. (2019). Endophyte *Bacillus subtilis* evade plant defense by producing lantibiotic subtilomycin to mask self-produced flagellin. *Communications Biology*, 2(1), Article 1. <https://doi.org/10.1038/s42003-019-0614-0>
- Dertz, E. A., Xu, J., Stintzi, A., et Raymond, K. N. (2006). Bacillibactin-Mediated Iron Transport in *Bacillus subtilis*. *Journal of the American Chemical Society*, 128(1), 22–23. <https://doi.org/10.1021/ja055898c>

- Dora, S., Terrett, O. M., et Sánchez-Rodríguez, C. (2022). Plant–microbe interactions in the apoplast: Communication at the plant cell wall. *The Plant Cell*, 34(5), 1532–1550. <https://doi.org/10.1093/plcell/koac040>
- Downie, H. F., Valentine, T. A., Otten, W., Spiers, A. J., et Dupuy, L. X. (2014). Transparent soil microcosms allow 3D spatial quantification of soil microbiological processes in vivo. *Plant Signaling & Behavior*, 9(10), e970421. <https://doi.org/10.4161/15592316.2014.970421>
- Driks, A. (1999). *Bacillus subtilis* Spore Coat. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 63(1), 1–20. <https://doi.org/10.1128/membr.63.1.1-20.1999>
- Dunbar, K. R., et Heintz, R. A. (1996). Chemistry of Transition Metal Cyanide Compounds: Modern Perspectives. In *Progress in Inorganic Chemistry* (pp. 283–391). John Wiley & Sons, Ltd. <https://doi.org/10.1002/9780470166468.ch4>
- Ezraty, B., Gennaris, A., Barras, F., et Collet, J.-F. (2017). Oxidative stress, protein damage and repair in bacteria. *Nature Reviews Microbiology*, 15(7), 385–396. <https://doi.org/10.1038/nrmicro.2017.26>
- Farvardin, A., González-Hernández, A. I., Llorens, E., García-Agustín, P., Scalschi, L., et Vicedo, B. (2020). The Apoplast: A Key Player in Plant Survival. *Antioxidants*, 9(7). <https://doi.org/10.3390/antiox9070604>
- Fasnacht, M., et Polacek, N. (2021). Oxidative Stress in Bacteria and the Central Dogma of Molecular Biology. *Frontiers in Molecular Biosciences*, 8. <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmolb.2021.671037>
- Feng, H., Fu, R., Hou, X., Lv, Y., Zhang, N., Liu, Y., Xu, Z., Miao, Y., Krell, T., Shen, Q., et Zhang, R. (2021). Chemotaxis of Beneficial Rhizobacteria to Root Exudates: The First Step towards Root–Microbe Rhizosphere Interactions. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(13). <https://doi.org/10.3390/ijms22136655>
- Fenton, H. J. H. (1894). LXXIII.—Oxidation of tartaric acid in presence of iron. *Journal of the Chemical Society, Transactions*, 65(0), 899–910. <https://doi.org/10.1039/CT8946500899>
- Finkel, O. M., Salas-González, I., Castrillo, G., Conway, J. M., Law, T. F., Teixeira, P. J. P. L., Wilson, E. D., Fitzpatrick, C. R., Jones, C. D., et Dangl, J. L. (2020). A

- single bacterial genus maintains root growth in a complex microbiome. *Nature*, 587(7832), Article 7832. <https://doi.org/10.1038/s41586-020-2778-7>
- Fischbacher, A., von Sonntag, C., et Schmidt, T. C. (2017). Hydroxyl radical yields in the Fenton process under various pH, ligand concentrations and hydrogen peroxide/Fe(II) ratios. *Chemosphere*, 182, 738–744. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2017.05.039>
- Flemming, H.-C., Wingender, J., Szewzyk, U., Steinberg, P., Rice, S. A., et Kjelleberg, S. (2016). Biofilms: An emergent form of bacterial life. *Nature Reviews Microbiology*, 14(9), Article 9. <https://doi.org/10.1038/nrmicro.2016.94>
- Fontenot, C. R., et Ding, H. (2023). Ferric uptake regulator (Fur) binds a [2Fe-2S] cluster to regulate intracellular iron homeostasis in *Escherichia coli*. *Journal of Biological Chemistry*, 299(6). <https://doi.org/10.1016/j.jbc.2023.104748>
- Frey, P. A., et Reed, G. H. (2012). The Ubiquity of Iron. *ACS Chemical Biology*, 7(9), 1477–1481. <https://doi.org/10.1021/cb300323q>
- Fuangthong, M., Herbig, A. F., Bsat, N., et Helmann, J. D. (2002). Regulation of the *Bacillus subtilis fur* and *perR* Genes by PerR: Not All Members of the PerR Regulon Are Peroxide Inducible. *Journal of Bacteriology*, 184(12), 3276–3286. <https://doi.org/10.1128/jb.184.12.3276-3286.2002>
- Fujita, M., González-Pastor, J. E., et Losick, R. (2005). High- and Low-Threshold Genes in the Spo0A Regulon of *Bacillus subtilis*. *Journal of Bacteriology*, 187(4), 1357–1368. <https://doi.org/10.1128/jb.187.4.1357-1368.2005>
- Fukushima, T., Allred, B. E., Sia, A. K., Nichiporuk, R., Andersen, U. N., et Raymond, K. N. (2013). Gram-positive siderophore-shuttle with iron-exchange from Fe-siderophore to apo-siderophore by *Bacillus cereus* YxeB. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 110(34), 13821–13826. <https://doi.org/10.1073/pnas.1304235110>
- Gaballa, A., et Helmann, J. D. (1998). Identification of a Zinc-Specific Metalloregulatory Protein, Zur, Controlling Zinc Transport Operons in *Bacillus subtilis*. *Journal of Bacteriology*, 180(22), 5815–5821. <https://doi.org/10.1128/jb.180.22.5815-5821.1998>

- Gaballa Ahmed, Wang Tao, Ye Rick W., et Helmann John D. (2002). Functional Analysis of the *Bacillus subtilis* Zur Regulon. *Journal of Bacteriology*, 184(23), 6508–6514. <https://doi.org/10.1128/JB.184.23.6508-6514.2002>
- Gao, Y., Amon, J. D., Artzi, L., Ramírez-Guadiana, F. H., Brock, K. P., Cofsky, J. C., Marks, D. S., Kruse, A. C., et Rudner, D. Z. (2023). Bacterial spore germination receptors are nutrient-gated ion channels. *Science*, 380(6643), 387–391. <https://doi.org/10.1126/science.adg9829>
- Georgiadis, M. M., Komiya, H., Chakrabarti, P., Woo, D., Kornuc, J. J., et Rees, D. C. (1992). Crystallographic Structure of the Nitrogenase Iron Protein from *Azotobacter vinelandii*. *Science*, 257(5077), 1653–1659. <https://doi.org/10.1126/science.1529353>
- Ghssein, G., et Ezzeddine, Z. (2022). A Review of *Pseudomonas aeruginosa* Metallophores: Pyoverdine, Pyochelin and Pseudopaline. *Biology*, 11(12), Article 12. <https://doi.org/10.3390/biology11121711>
- Glasfeld, A., Guedon, E., Helmann, J. D., et Brennan, R. G. (2003). Structure of the manganese-bound manganese transport regulator of *Bacillus subtilis*. *Nature Structural & Molecular Biology*, 10(8), Article 8. <https://doi.org/10.1038/nsb951>
- Gondry, M., Sauguet, L., Belin, P., Thai, R., Amouroux, R., Tellier, C., Tuphile, K., Jacquet, M., Braud, S., Courçon, M., Masson, C., Dubois, S., Lautru, S., Lecoq, A., Hashimoto, S., Genet, R., et Pernodet, J.-L. (2009). Cyclodipeptide synthases are a family of tRNA-dependent peptide bond-forming enzymes. *Nature Chemical Biology*, 5(6), 414–420. <https://doi.org/10.1038/nchembio.175>
- Gozzi, K., Ching, C., Paruthiyil, S., Zhao, Y., Godoy-Carter, V., et Chai, Y. (2017). *Bacillus subtilis* utilizes the DNA damage response to manage multicellular development. *Npj Biofilms and Microbiomes*, 3(1), Article 1. <https://doi.org/10.1038/s41522-017-0016-3>
- Granato, E. T., Smith, W. P. J., et Foster, K. R. (2023). Collective protection against the type VI secretion system in bacteria. *The ISME Journal*, 17, 1052–1062. <https://doi.org/10.1038/s41396-023-01401-4>
- Grandchamp, G. M., Caro, L., et Shank, E. A. (2017). Pirated Siderophores Promote Sporulation in *Bacillus subtilis*. *Applied and Environmental Microbiology*, 83(10), e03293-16. <https://doi.org/10.1128/AEM.03293-16>

- Grossman, A. D., et Losick, R. (1988). Extracellular control of spore formation in *Bacillus subtilis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 85(12), 4369–4373. <https://doi.org/10.1073/pnas.85.12.4369>
- Gu, S., Wei, Z., Shao, Z., Friman, V.-P., Cao, K., Yang, T., Kramer, J., Wang, X., Li, M., Mei, X., Xu, Y., Shen, Q., Kümmerli, R., et Jousset, A. (2020). Competition for iron drives phytopathogen control by natural rhizosphere microbiomes. *Nature Microbiology*, 5(8), 1002–1010. <https://doi.org/10.1038/s41564-020-0719-8>
- Guan, G., Pinochet-Barros, A., Gaballa, A., Patel, S. J., Argüello, J. M., et Helmann, J. D. (2015). PfeT, a P1B4-type ATPase, effluxes ferrous iron and protects *Bacillus subtilis* against iron intoxication. *Molecular Microbiology*, 98(4), 787–803. <https://doi.org/10.1111/mmi.13158>
- Haber, F., et Weiss, J. (1932). Über die Katalyse des Hydroperoxydes. *Naturwissenschaften*, 20(51), 948–950. <https://doi.org/10.1007/BF01504715>
- Hacquard, S., Garrido-Oter, R., González, A., Spaepen, S., Ackermann, G., Lebeis, S., McHardy, A. C., Dangl, J. L., Knight, R., Ley, R., et Schulze-Lefert, P. (2015). Microbiota and Host Nutrition across Plant and Animal Kingdoms. *Cell Host & Microbe*, 17(5), 603–616. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2015.04.009>
- Haichar, F. el Z., Marol, C., Berge, O., Rangel-Castro, J. I., Prosser, J. I., Balesdent, J., Heulin, T., et Achouak, W. (2008). Plant host habitat and root exudates shape soil bacterial community structure. *The ISME Journal*, 2(12), Article 12. <https://doi.org/10.1038/ismej.2008.80>
- Hamon, M. A., et Lazazzera, B. A. (2001). The sporulation transcription factor Spo0A is required for biofilm development in *Bacillus subtilis*. *Molecular Microbiology*, 42(5), 1199–1209. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.2001.02709.x>
- Hannauer, M., Braud, A., Hoegy, F., Ronot, P., Boos, A., et Schalk, I. J. (2012). The PvdRT-OpmQ efflux pump controls the metal selectivity of the iron uptake pathway mediated by the siderophore pyoverdine in *Pseudomonas aeruginosa*. *Environmental Microbiology*, 14(7), 1696–1708. <https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2011.02674.x>
- Harbort, C. J., Hashimoto, M., Inoue, H., Niu, Y., Guan, R., Rombolà, A. D., Kopriva, S., Voges, M. J. E. E. E., Sattely, E. S., Garrido-Oter, R., et Schulze-Lefert, P. (2020). Root-Secreted Coumarins and the Microbiota Interact to Improve Iron

Nutrition in Arabidopsis. *Cell Host et Microbe*, 28(6), 825-837.e6.  
<https://doi.org/10.1016/j.chom.2020.09.006>

Hardoim, P. R., van Overbeek, L. S., Berg, G., Pirttilä, A. M., Compant, S., Campisano, A., Döring, M., et Sessitsch, A. (2015). The Hidden World within Plants: Ecological and Evolutionary Considerations for Defining Functioning of Microbial Endophytes. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 79(3), 293–320.  
<https://doi.org/10.1128/membr.00050-14>

Hartmann, A., Rothballer, M., et Schmid, M. (2008). Lorenz Hiltner, a pioneer in rhizosphere microbial ecology and soil bacteriology research. *Plant and Soil*, 312(1), 7–14. <https://doi.org/10.1007/s11104-007-9514-z>

Heese, A., Hann, D. R., Gimenez-Ibanez, S., Jones, A. M. E., He, K., Li, J., Schroeder, J. I., Peck, S. C., et Rathjen, J. P. (2007). The receptor-like kinase SERK3/BAK1 is a central regulator of innate immunity in plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 104(29), 12217–12222.  
<https://doi.org/10.1073/pnas.0705306104>

Higgins, D., et Dworkin, J. (2012). Recent progress in *Bacillus subtilis* sporulation. *FEMS Microbiology Reviews*, 36(1), 131–148. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2011.00310.x>

Hiltner, L. (1904). Über neuere Erfahrungen und Probleme auf dem Gebiet der Bodenbakteriologie und unter besonderer Berücksichtigung der Grundung und Brache. *Arbeiten Der Deutschen Landwirtschaftlichen Gesellschaft*, 98, 59–78.

Hobley, L., Ostrowski, A., Rao, F. V., Bromley, K. M., Porter, M., Prescott, A. R., MacPhee, C. E., van Aalten, D. M. F., et Stanley-Wall, N. R. (2013). BslA is a self-assembling bacterial hydrophobin that coats the *Bacillus subtilis* biofilm. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 110(33), 13600–13605.  
<https://doi.org/10.1073/pnas.1306390110>

Hong, Y., Zeng, J., Wang, X., Drlica, K., et Zhao, X. (2019). Post-stress bacterial cell death mediated by reactive oxygen species. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 116(20), 10064–10071.  
<https://doi.org/10.1073/pnas.1901730116>

- Hou, S., Liu, D., Huang, S., Luo, D., Liu, Z., Xiang, Q., Wang, P., Mu, R., Han, Z., Chen, S., Chai, J., Shan, L., et He, P. (2021). The *Arabidopsis* MIK2 receptor elicits immunity by sensing a conserved signature from phyto cytokines and microbes. *Nature Communications*, 12(1), 5494. <https://doi.org/10.1038/s41467-021-25580-w>
- Hu, Y., Ding, Y., Cai, B., Qin, X., Wu, J., Yuan, M., Wan, S., Zhao, Y., et Xin, X.-F. (2022). Bacterial effectors manipulate plant abscisic acid signaling for creation of an aqueous apoplast. *Cell Host & Microbe*, 30(4), 518-529.e6. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2022.02.002>
- Igarashi, T., et Setlow, P. (2006). Transcription of the *Bacillus subtilis* gerK Operon, Which Encodes a Spore Germinant Receptor, and Comparison with That of Operons Encoding Other Germinant Receptors. *Journal of Bacteriology*, 188(11), 4131–4136. <https://doi.org/10.1128/jb.00265-06>
- Imlay, J. A. (2013). The molecular mechanisms and physiological consequences of oxidative stress: Lessons from a model bacterium. *Nature Reviews Microbiology*, 11(7), Article 7. <https://doi.org/10.1038/nrmicro3032>
- Jeuken Lars J. C., Hards Kiel, et Nakatani Yoshio. (2020). Extracellular Electron Transfer: Respiratory or Nutrient Homeostasis? *Journal of Bacteriology*, 202(7), e00029-20. <https://doi.org/10.1128/JB.00029-20>
- Jolivet, J.-P., Chanéac, C., et Tronc, E. (2004). Iron oxide chemistry. From molecular clusters to extended solid networks. *Chemical Communications*, 5, 481–483. <https://doi.org/10.1039/B304532N>
- Jones, J. D. G., et Dangl, J. L. (2006). The plant immune system. *Nature*, 444(7117), Article 7117. <https://doi.org/10.1038/nature05286>
- Julian, W. T., Vasilchenko, A. V., Shpindyuk, D. D., Poshvina, D. V., et Vasilchenko, A. S. (2021). Bacterial-Derived Plant Protection Metabolite 2,4-Diacetylphloroglucinol: Effects on Bacterial Cells at Inhibitory and Subinhibitory Concentrations. *Biomolecules*, 11(1), Article 1. <https://doi.org/10.3390/biom11010013>
- Kang, X., Kirui, A., Dickwella Widanage, M. C., Mentink-Vigier, F., Cosgrove, D. J., et Wang, T. (2019). Lignin-polysaccharide interactions in plant secondary cell walls



revealed by solid-state NMR. *Nature Communications*, 10(1), Article 1. <https://doi.org/10.1038/s41467-018-08252-0>

Kearns, D. B., Chu, F., Branda, S. S., Kolter, R., et Losick, R. (2005). A master regulator for biofilm formation by *Bacillus subtilis*. *Molecular Microbiology*, 55(3), 739–749. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2004.04440.x>

Kehl-Fie, T. E., et Skaar, E. P. (2010). Nutritional immunity beyond iron: A role for manganese and zinc. *Current Opinion in Chemical Biology*, 14(2), 218–224. <https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2009.11.008>

Kehrer, J. P. (2000). The Haber–Weiss reaction and mechanisms of toxicity. *Toxicology*, 149(1), 43–50. [https://doi.org/10.1016/S0300-483X\(00\)00231-6](https://doi.org/10.1016/S0300-483X(00)00231-6)

Keyer, K., et Imlay, J. A. (1996). Superoxide accelerates DNA damage by elevating free-iron levels. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 93(24), 13635–13640. <https://doi.org/10.1073/pnas.93.24.13635>

Kidarsa, T. A., Goebel, N. C., Zabriskie, T. M., et Loper, J. E. (2011). Phloroglucinol mediates cross-talk between the pyoluteorin and 2,4-diacetylphloroglucinol biosynthetic pathways in *Pseudomonas fluorescens* Pf-5. *Molecular Microbiology*, 81(2), 395–414. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2011.07697.x>

Kikuchi, K., Galera-Laporta, L., Weatherwax, C., Lam, J. Y., Moon, E. C., Theodorakis, E. A., Garcia-Ojalvo, J., et Süel, G. M. (2022). Electrochemical potential enables dormant spores to integrate environmental signals. *Science*, 378(6615), 43–49. <https://doi.org/10.1126/science.abl7484>

Kloepper, J. W., Leong, J., Teintze, M., et Schroth, M. N. (1980). Enhanced plant growth by siderophores produced by plant growth-promoting rhizobacteria. *Nature*, 286(5776), Article 5776. <https://doi.org/10.1038/286885a0>

Kloepper, J. W., et Schroth, M. N. (1981). Plant Growth-Promoting Rhizobacteria and Plant Growth Under Gnotobiotic Conditions. *Phytopathology*, 71, 642–644.

Kluyver, A. J., van der Walt, J. P., et van Triet, A. J. (1953). Pulcherrimin, The Pigment of *Candida Pulcherrima*\*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 39(7), 583–593. <https://doi.org/10.1073/pnas.39.7.583>

- Kolodkin-Gal, I., Elsholz, A. K. W., Muth, C., Girguis, P. R., Kolter, R., et Losick, R. (2013). Respiration control of multicellularity in *Bacillus subtilis* by a complex of the cytochrome chain with a membrane-embedded histidine kinase. *Genes & Development*, 27(8), 887–899. <https://doi.org/10.1101/gad.215244.113>
- Koo, B.-M., Kritikos, G., Farelli, J. D., Todor, H., Tong, K., Kimsey, H., Wapinski, I., Galardini, M., Cabal, A., Peters, J. M., Hachmann, A.-B., Rudner, D. Z., Allen, K. N., Typas, A., et Gross, C. A. (2017). Construction and Analysis of Two Genome-Scale Deletion Libraries for *Bacillus subtilis*. *Cell Systems*, 4(3), 291–305.e7. <https://doi.org/10.1016/j.cels.2016.12.013>
- Korenblum, E., Dong, Y., Szymanski, J., Panda, S., Jozwiak, A., Massalha, H., Meir, S., Rogachev, I., et Aharoni, A. (2020). Rhizosphere microbiome mediates systemic root metabolite exudation by root-to-root signaling. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 117(7), 3874–3883. <https://doi.org/10.1073/pnas.1912130117>
- Kovács, Á. T. (2019). *Bacillus subtilis*. *Trends in Microbiology*, 27(8), 724–725. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2019.03.008>
- Kraemer, S. M., Duckworth, O. W., Harrington, J. M., et Schenkeveld, W. D. C. (2015). Metallophores and Trace Metal Biogeochemistry. *Aquatic Geochemistry*, 21(2), 159–195. <https://doi.org/10.1007/s10498-014-9246-7>
- Kramer, J., Özkaya, Ö., et Kümmerli, R. (2020). Bacterial siderophores in community and host interactions. *Nature Reviews Microbiology*, 18(3), 152–163. <https://doi.org/10.1038/s41579-019-0284-4>
- Krause, D. J., Kominek, J., Ofulente, D. A., Shen, X.-X., Zhou, X., Langdon, Q. K., DeVirgilio, J., Hulfachor, A. B., Kurtzman, C. P., Rokas, A., et Hittinger, C. T. (2018). Functional and evolutionary characterization of a secondary metabolite gene cluster in budding yeasts. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 115(43), 11030–11035. <https://doi.org/10.1073/pnas.1806268115>
- Kurzak, B., Kozłowski, H., et Farkas, E. (1992). Hydroxamic and aminohydroxamic acids and their complexes with metal ions. *Coordination Chemistry Reviews*, 114(2), 169–200. [https://doi.org/10.1016/0010-8545\(92\)85002-8](https://doi.org/10.1016/0010-8545(92)85002-8)
- Kwon, O. S., Park, S. H., Yun, B.-S., Pyun, Y. R., et Kim, C.-J. (2000). Cjcclo(Dehydroala-L-Leu), an  $\alpha$ -Glucosidase Inhibitor from *Penicillium* sp. F7Q6I4. *The Journal of Antibiotics*, 53(9), 954–958. <https://doi.org/10.7164/antibiotics.53.954>

- Laville, J., Blumer, C., Von Schroetter, C., Gaia, V., Défago, G., Keel, C., et Haas, D. (1998). Characterization of the hcnABC Gene Cluster Encoding Hydrogen Cyanide Synthase and Anaerobic Regulation by ANR in the Strictly Aerobic Biocontrol Agent *Pseudomonas fluorescens* CHA0. *Journal of Bacteriology*, 180(12), 3187–3196. <https://doi.org/10.1128/jb.180.12.3187-3196.1998>
- Lécuyer, F., Bourassa, J.-S., Gélinas, M., Charron-Lamoureux, V., Burrus, V., et Beaugregard, P. B. (2018). Biofilm Formation Drives Transfer of the Conjugative Element ICEBs1 in *Bacillus subtilis*. *MSphere*, 3(5), 10.1128/msphere.00473-18. <https://doi.org/10.1128/msphere.00473-18>
- LeDeaux, J. R., Yu, N., et Grossman, A. D. (1995). Different roles for KinA, KinB, and KinC in the initiation of sporulation in *Bacillus subtilis*. *Journal of Bacteriology*, 177(3), 861–863. <https://doi.org/10.1128/jb.177.3.861-863.1995>
- Lee, J.-W., et Helmann, J. D. (2006). The PerR transcription factor senses H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> by metal-catalysed histidine oxidation. *Nature*, 440(7082), 363–367. <https://doi.org/10.1038/nature04537>
- Legein, M., Smets, W., Vandenheuvel, D., Eilers, T., Muyschondt, B., Prinsen, E., Samson, R., et Lebeer, S. (2020). Modes of Action of Microbial Biocontrol in the Phyllosphere. *Frontiers in Microbiology*, 11. <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmicb.2020.01619>
- Leventhal, G. E., Ackermann, M., et Schiessl, K. T. (2019). Why microbes secrete molecules to modify their environment: The case of iron-chelating siderophores. *Journal of The Royal Society Interface*, 16(150), 20180674. <https://doi.org/10.1098/rsif.2018.0674>
- Light, S. H., Su, L., Rivera-Lugo, R., Cornejo, J. A., Louie, A., Iavarone, A. T., Ajo-Franklin, C. M., et Portnoy, D. A. (2018). A flavin-based extracellular electron transfer mechanism in diverse Gram-positive bacteria. *Nature*, 562(7725), Article 7725. <https://doi.org/10.1038/s41586-018-0498-z>
- Lindemann, J., et Upper, C. D. (1985). Aerial Dispersal of Epiphytic Bacteria over Bean Plants. *Applied and Environmental Microbiology*, 50(5), 1229–1232. <https://doi.org/10.1128/aem.50.5.1229-1232.1985>

- Lindow Steven E. et Brandl Maria T. (2003). Microbiology of the Phyllosphere. *Applied and Environmental Microbiology*, 69(4), 1875–1883. <https://doi.org/10.1128/AEM.69.4.1875-1883.2003>
- Liu, Y., Shu, X., Chen, L., Zhang, H., Feng, H., Sun, X., Xiong, Q., Li, G., Xun, W., Xu, Z., Zhang, N., Pieterse, C. M. J., Shen, Q., et Zhang, R. (2023). Plant commensal type VII secretion system causes iron leakage from roots to promote colonization. *Nature Microbiology*, 1–16. <https://doi.org/10.1038/s41564-023-01402-1>
- Lopez, D., Vlamakis, H., et Kolter, R. (2009). Generation of multiple cell types in *Bacillus subtilis*. *FEMS Microbiology Reviews*, 33(1), 152–163. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2008.00148.x>
- Lozano-Andrade, C. N., Nogueira, C. G., Wibowo, M., et Kovács, Á. T. (2022). Establishment of a transparent soil system to study *Bacillus subtilis* chemical ecology (p. 2022.01.10.475645). bioRxiv. <https://doi.org/10.1101/2022.01.10.475645>
- Ludington, W. B. (2022). Higher-order microbiome interactions and how to find them. *Trends in Microbiology*, 30(7), 618–621. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2022.03.011>
- Lyng, M., et Kovács, Á. T. (2023). Frenemies of the soil: *Bacillus* and *Pseudomonas* interspecies interactions. *Trends in Microbiology*. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2023.02.003>
- Mah, T.-F. C., et O'Toole, G. A. (2001). Mechanisms of biofilm resistance to antimicrobial agents. *Trends in Microbiology*, 9(1), 34–39. [https://doi.org/10.1016/S0966-842X\(00\)01913-2](https://doi.org/10.1016/S0966-842X(00)01913-2)
- Martinez, J. S., Carter-Franklin, J. N., Mann, E. L., Martin, J. D., Haygood, M. G., et Butler, A. (2003). Structure and membrane affinity of a suite of amphiphilic siderophores produced by a marine bacterium. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 100(7), 3754–3759. <https://doi.org/10.1073/pnas.0637444100>
- Martins, M. B., et Carvalho, I. (2007). Diketopiperazines: Biological activity and synthesis. *Tetrahedron*, 63(40), 9923–9932. <https://doi.org/10.1016/j.tet.2007.04.105>

- Massalha, H., Korenblum, E., Malitsky, S., Shapiro, O. H., et Aharoni, A. (2017). Live imaging of root–bacteria interactions in a microfluidics setup. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 114(17), 4549–4554. <https://doi.org/10.1073/pnas.1618584114>
- May, J. J., Wendrich, T. M., et Marahiel, M. A. (2001). The *dhb* Operon of *Bacillus subtilis* Encodes the Biosynthetic Template for the Catecholic Siderophore 2,3-Dihydroxybenzoate-Glycine-Threonine Trimeric Ester Bacillibactin \*. *Journal of Biological Chemistry*, 276(10), 7209–7217. <https://doi.org/10.1074/jbc.M009140200>
- McNear Jr., D. H. (2013). The Rhizosphere—Roots, Soil and Everything In Between. *Nature Education Knowledge*, 4(3), 1.
- McRose, D. L., Li, J., et Newman, D. K. (2023). The chemical ecology of coumarins and phenazines affects iron acquisition by pseudomonads. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 120(14), e2217951120. <https://doi.org/10.1073/pnas.2217951120>
- McRose, D. L., et Newman, D. K. (2021). Redox-active antibiotics enhance phosphorus bioavailability. *Science*, 371(6533), 1033–1037. <https://doi.org/10.1126/science.abd1515>
- Medema, M. H., Kottmann, R., Yilmaz, P., Cummings, M., Biggins, J. B., Blin, K., de Bruijn, I., Chooi, Y. H., Claesen, J., Coates, R. C., Cruz-Morales, P., Duddela, S., Düsterhus, S., Edwards, D. J., Fewer, D. P., Garg, N., Geiger, C., Gomez-Escribano, J. P., Greule, A., ... Glöckner, F. O. (2015). Minimum Information about a Biosynthetic Gene cluster. *Nature Chemical Biology*, 11(9), Article 9. <https://doi.org/10.1038/nchembio.1890>
- Melvydas, V., Staneviciene, R., Balynaite, A., Vaiciuniene, J., et Garjonyte, R. (2016). Formation of self-organized periodic patterns around yeasts secreting a precursor of a red pigment. *Microbiological Research*, 193, 87–93. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2016.09.007>
- Mendis, H. C., Thomas, V. P., Schwientek, P., Salamzade, R., Chien, J.-T., Waidyarathne, P., Kloepper, J., et De La Fuente, L. (2018). Strain-specific quantification of root colonization by plant growth promoting rhizobacteria *Bacillus firmus* I-1582 and *Bacillus amyloliquefaciens* QST713 in non-sterile soil

and field conditions. *PLOS ONE*, 13(2), e0193119. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0193119>

Miethke, M., Klotz, O., Linne, U., May, J. J., Beckering, C. L., et Marahiel, M. A. (2006). Ferri-bacillibactin uptake and hydrolysis in *Bacillus subtilis*. *Molecular Microbiology*, 61(6), 1413–1427. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2006.05321.x>

Miethke, M., Kraushaar, T., et Marahiel, M. A. (2013). Uptake of xenosiderophores in *Bacillus subtilis* occurs with high affinity and enhances the folding stabilities of substrate binding proteins. *FEBS Letters*, 587(2), 206–213. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2012.11.027>

Miethke, M., Monteferrante, C. G., Marahiel, M. A., & van Dijk, J. M. (2013). The *Bacillus subtilis* EfeUOB transporter is essential for high-affinity acquisition of ferrous and ferric iron. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*, 1833(10), 2267–2278. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2013.05.027>

Miethke Marcus, Schmidt Sarah, et Marahiel Mohamed A. (2008). The Major Facilitator Superfamily-Type Transporter YmfE and the Multidrug-Efflux Activator Mta Mediate Bacillibactin Secretion in *Bacillus subtilis*. *Journal of Bacteriology*, 190(15), 5143–5152. <https://doi.org/10.1128/JB.00464-08>

Millet, Y. A., Danna, C. H., Clay, N. K., Songnuan, W., Simon, M. D., Werck-Reichhart, D., et Ausubel, F. M. (2010). Innate Immune Responses Activated in *Arabidopsis* Roots by Microbe-Associated Molecular Patterns. *The Plant Cell*, 22(3), 973–990. <https://doi.org/10.1105/tpc.109.069658>

Molina-Santiago, C., Pearson, J. R., Navarro, Y., Berlanga-Clavero, M. V., Caraballo-Rodríguez, A. M., Petras, D., García-Martín, M. L., Lamon, G., Habenstein, B., Cazorla, F. M., de Vicente, A., Loquet, A., Dorrestein, P. C., et Romero, D. (2019). The extracellular matrix protects *Bacillus subtilis* colonies from *Pseudomonas* invasion and modulates plant co-colonization. *Nature Communications*, 10(1), Article 1. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-09944-x>

Molina-Santiago, C., Vela-Corcía, D., Petras, D., Díaz-Martínez, L., Pérez-Lorente, A. I., Sopenña-Torres, S., Pearson, J., Caraballo-Rodríguez, A. M., Dorrestein, P. C., de Vicente, A., et Romero, D. (2021). Chemical interplay and complementary adaptive strategies toggle bacterial antagonism and co-existence. *Cell Reports*, 36(4). <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2021.109449>

- Müller, S., Strack, S. N., Hoefler, B. C., Straight, P. D., Kearns, D. B., et Kirby, J. R. (2014). Bacillaene and Sporulation Protect *Bacillus subtilis* from Predation by *Myxococcus xanthus*. *Applied and Environmental Microbiology*, 80(18), 5603–5610. <https://doi.org/10.1128/AEM.01621-14>
- Murdoch, C. C., et Skaar, E. P. (2022). Nutritional immunity: The battle for nutrient metals at the host–pathogen interface. *Nature Reviews Microbiology*, 20(11), 657–670. <https://doi.org/10.1038/s41579-022-00745-6>
- Nicholson, W. L., Munakata, N., Horneck, G., Melosh, H. J., et Setlow, P. (2000). Resistance of *Bacillus* Endospores to Extreme Terrestrial and Extraterrestrial Environments. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 64(3), 548–572. <https://doi.org/10.1128/mnbr.64.3.548-572.2000>
- Nishikawa Masaki et Kobayashi Kazuo. (2021). Calcium Prevents Biofilm Dispersion in *Bacillus subtilis*. *Journal of Bacteriology*, 203(14), 10.1128/jb.00114-21. <https://doi.org/10.1128/jb.00114-21>
- Noinaj, N., Guillier, M., Barnard, Travis J., et Buchanan, S. K. (2010). TonB-Dependent Transporters: Regulation, Structure, and Function. *Annual Review of Microbiology*, 64(1), 43–60. <https://doi.org/10.1146/annurev.micro.112408.134247>
- Nordgaard, M., Blake, C., Maróti, G., Hu, G., Wang, Y., Strube, M. L., et Kovács, Á. T. (2022). Experimental evolution of *Bacillus subtilis* on *Arabidopsis thaliana* roots reveals fast adaptation and improved root colonization. *IScience*, 25(6), 104406. <https://doi.org/10.1016/j.isci.2022.104406>
- Nowak-Thompson, B., Chaney, N., Wing, J. S., Gould, S. J., et Loper, J. E. (1999). Characterization of the Pyoluteorin Biosynthetic Gene Cluster of *Pseudomonas fluorescens* Pf-5. *Journal of Bacteriology*, 181(7), 2166–2174. <https://doi.org/10.1128/jb.181.7.2166-2174.1999>
- Nye, T. M., Schroeder, J. W., Kearns, D. B., et Simmons, L. A. (2017). Complete Genome Sequence of Undomesticated *Bacillus subtilis* Strain NCIB 3610. *Genome Announcements*, 5(20), 10.1128/genomea.00364-17. <https://doi.org/10.1128/genomea.00364-17>
- Ochiai, A., Itoh, T., Kawamata, A., Hashimoto, W., et Murata, K. (2007). Plant Cell Wall Degradation by Saprophytic *Bacillus subtilis* Strains: Gene Clusters Responsible

- for Rhamnogalacturonan Depolymerization. *Applied and Environmental Microbiology*, 73(12), 3803–3813. <https://doi.org/10.1128/AEM.00147-07>
- Ollinger, J., Song, K.-B., Antelmann, H., Hecker, M., et Helmann, J. D. (2006). Role of the Fur Regulon in Iron Transport in *Bacillus subtilis*. *Journal of Bacteriology*, 188(10), 3664–3673. <https://doi.org/10.1128/jb.188.10.3664-3673.2006>
- Ongena, M., Jourdan, E., Adam, A., Paquot, M., Brans, A., Joris, B., Arpigny, J.-L., et Thonart, P. (2007). Surfactin and fengycin lipopeptides of *Bacillus subtilis* as elicitors of induced systemic resistance in plants. *Environmental Microbiology*, 9(4), 1084–1090. <https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2006.01202.x>
- Paidhungat, M., et Setlow, P. (2000). Role of Ger Proteins in Nutrient and Nonnutrient Triggering of Spore Germination in *Bacillus subtilis*. *Journal of Bacteriology*, 182(9), 2513–2519. <https://doi.org/10.1128/jb.182.9.2513-2519.2000>
- Pang, Z., Chen, J., Wang, T., Gao, C., Li, Z., Guo, L., Xu, J., et Cheng, Y. (2021). Linking Plant Secondary Metabolites and Plant Microbiomes: A Review. *Frontiers in Plant Science*, 12. <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fpls.2021.621276>
- Paulsen, I. T., Press, C. M., Ravel, J., Kobayashi, D. Y., Myers, G. S. A., Mavrodi, D. V., DeBoy, R. T., Seshadri, R., Ren, Q., Madupu, R., Dodson, R. J., Durkin, A. S., Brinkac, L. M., Daugherty, S. C., Sullivan, S. A., Rosovitz, M. J., Gwinn, M. L., Zhou, L., Schneider, D. J., ... Loper, J. E. (2005). Complete genome sequence of the plant commensal *Pseudomonas fluorescens* Pf-5. *Nature Biotechnology*, 23(7), 873–878. <https://doi.org/10.1038/nbt1110>
- Pérez-Guzmán, L., Bogner, K. R., et Lower, B. H. (2010). *Earth's Ferrous Wheel* | *Learn Science at Scitable*. <https://www.nature.com/scitable/knowledge/library/earth-s-ferrous-wheel-15180940/>
- Pérez-Lorente Alicia I., Molina-Santiago Carlos, de Vicente Antonio, et Romero Diego. (2023). Sporulation Activated via  $\sigma^W$  Protects *Bacillus* from a Tse1 Peptidoglycan Hydrolase Type VI Secretion System Effector. *Microbiology Spectrum*, 11(2), e05045-22. <https://doi.org/10.1128/spectrum.05045-22>
- Pieterse, C. M. J., Zamioudis, C., Berendsen, R. L., Weller, D. M., Van Wees, S. C. M., et Bakker, P. A. H. M. (2014). Induced Systemic Resistance by Beneficial



- Microbes. *Annual Review of Phytopathology*, 52(1), 347–375. <https://doi.org/10.1146/annurev-phyto-082712-102340>
- Porwal, S. K., Furia, E., Harris, M. E., Viswanathan, R., et Devireddy, L. (2015). Synthetic, potentiometric and spectroscopic studies of chelation between Fe(III) and 2,5-DHBA supports salicylate-mode of siderophore binding interactions. *Journal of Inorganic Biochemistry*, 145, 1–10. <https://doi.org/10.1016/j.jinorgbio.2014.12.010>
- Powers, M. J., Sanabria-Valentín, E., Bowers, A. A., et Shank, E. A. (2015). Inhibition of Cell Differentiation in *Bacillus subtilis* by *Pseudomonas protegens*. *Journal of Bacteriology*, 197(13), 2129–2138. <https://doi.org/10.1128/jb.02535-14>
- Puig, S., Ramos-Alonso, L., Romero, A. M., et Martínez-Pastor, M. T. (2017). The elemental role of iron in DNA synthesis and repair. *Metallomics*, 9(11), 1483–1500. <https://doi.org/10.1039/c7mt00116a>
- Qin, Y., He, Y., She, Q., Larese-Casanova, P., Li, P., et Chai, Y. (2019). Heterogeneity in respiratory electron transfer and adaptive iron utilization in a bacterial biofilm. *Nature Communications*, 10(1), 3702. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-11681-0>
- Randazzo, P., Aubert-Frambourg, A., Guillot, A., et Auger, S. (2016). The MarR-like protein PchR (YvmB) regulates expression of genes involved in pulcherriminic acid biosynthesis and in the initiation of sporulation in *Bacillus subtilis*. *BMC Microbiology*, 16(1), 190. <https://doi.org/10.1186/s12866-016-0807-3>
- Randazzo Paola, Anba-Mondoloni Jamila, Aubert-Frambourg Anne, Guillot Alain, Pechoux Christine, Vidic Jasmina, et Auger Sandrine. (2020). *Bacillus subtilis* Regulators MntR and Zur Participate in Redox Cycling, Antibiotic Sensitivity, and Cell Wall Plasticity. *Journal of Bacteriology*, 202(5), e00547-19. <https://doi.org/10.1128/JB.00547-19>
- Reinhold-Hurek, B., Bünger, W., Burbano, C. S., Sabale, M., et Hurek, T. (2015). Roots Shaping Their Microbiome: Global Hotspots for Microbial Activity. *Annual Review of Phytopathology*, 53(1), 403–424. <https://doi.org/10.1146/annurev-phyto-082712-102342>

- Rizaludin, M. S., Stopnisek, N., Raaijmakers, J. M., et Garbeva, P. (2021). The Chemistry of Stress: Understanding the 'Cry for Help' of Plant Roots. *Metabolites*, 11(6). <https://doi.org/10.3390/metabo11060357>
- Rizzi, A., Leroux, J., Charron-Lamoureux, V., Roy, S., Beauregard, P. B., et Bellenger, J.-P. (2020). *Bacillus subtilis* Modulates Its Usage of Biofilm-Bound Iron in Response to Environmental Iron Availability. *Applied and Environmental Microbiology*, 86(22), e00944-20. <https://doi.org/10.1128/AEM.00944-20>
- Rizzi, A., Roy, S., Bellenger, J.-P., et Beauregard, P. B. (2019). Iron Homeostasis in *Bacillus subtilis* Requires Siderophore Production and Biofilm Formation. *Applied and Environmental Microbiology*, 85(3), e02439-18. <https://doi.org/10.1128/AEM.02439-18>
- Rosier, A., Beauregard, P. B., et Bais, H. P. (2021). Quorum Quenching Activity of the PGPR *Bacillus subtilis* UD1022 Alters Nodulation Efficiency of Sinorhizobium meliloti on Medicago truncatula. *Frontiers in Microbiology*, 11. <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmicb.2020.596299>
- Roussin-Léveillé, C., Lajeunesse, G., St-Amand, M., Veerapen, V. P., Silva-Martins, G., Nomura, K., Brassard, S., Bolaji, A., He, S. Y., et Moffett, P. (2022). Evolutionarily conserved bacterial effectors hijack abscisic acid signaling to induce an aqueous environment in the apoplast. *Cell Host et Microbe*, 30(4), 489-501.e4. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2022.02.006>
- Rudrappa, T., Czymmek, K. J., Paré, P. W., et Bais, H. P. (2008). Root-Secreted Malic Acid Recruits Beneficial Soil Bacteria. *Plant Physiology*, 148(3), 1547–1556. <https://doi.org/10.1104/pp.108.127613>
- Rychel, K., Sastry, A. V., et Palsson, B. O. (2020). Machine learning uncovers independently regulated modules in the *Bacillus subtilis* transcriptome. *Nature Communications*, 11(1), 6338. <https://doi.org/10.1038/s41467-020-20153-9>
- Ryu, C.-M., Farag, M. A., Hu, C.-H., Reddy, M. S., Wei, H.-X., Paré, P. W., et Kloepper, J. W. (2003). Bacterial volatiles promote growth in *Arabidopsis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 100(8), 4927–4932. <https://doi.org/10.1073/pnas.0730845100>

- Santi, S., et Schmidt, W. (2009). Dissecting iron deficiency-induced proton extrusion in *Arabidopsis* roots. *New Phytologist*, 183(4), 1072–1084. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2009.02908.x>
- Sarah M. Yannarell, Eric S. Beaudoin, Hunter S. Talley, Alexi A. Schoenborn, Galya Orr, Christopher R. Anderton, William B. Chrisler, et Elizabeth A Shank. (2022). Extensive cellular multitasking within *Bacillus subtilis* biofilms. *BioRxiv*, 2022.09.02.506450. <https://doi.org/10.1101/2022.09.02.506450>
- Schmidt, R., Cordovez, V., de Boer, W., Raaijmakers, J., et Garbeva, P. (2015). Volatile affairs in microbial interactions. *The ISME Journal*, 9(11), Article 11. <https://doi.org/10.1038/ismej.2015.42>
- Schmitz, L., Yan, Z., Schneijderberg, M., de Roij, M., Pijnenburg, R., Zheng, Q., Franken, C., Dechesne, A., Trindade, L. M., van Velzen, R., Bisseling, T., Geurts, R., et Cheng, X. (2022). Synthetic bacterial community derived from a desert rhizosphere confers salt stress resilience to tomato in the presence of a soil microbiome. *The ISME Journal*, 16(8), Article 8. <https://doi.org/10.1038/s41396-022-01238-3>
- Schönbichler, A., Díaz-Moreno, S. M., Srivastava, V., et McKee, L. S. (2020). Exploring the Potential for Fungal Antagonism and Cell Wall Attack by *Bacillus subtilis* natto. *Frontiers in Microbiology*, 11. <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmicb.2020.00521>
- Schröder, I., Johnson, E., et de Vries, S. (2003). Microbial ferric iron reductases. *FEMS Microbiology Reviews*, 27(2–3), 427–447. [https://doi.org/10.1016/S0168-6445\(03\)00043-3](https://doi.org/10.1016/S0168-6445(03)00043-3)
- Sharma, D., Misba, L., et Khan, A. U. (2019). Antibiotics versus biofilm: An emerging battleground in microbial communities. *Antimicrobial Resistance & Infection Control*, 8(1), 76. <https://doi.org/10.1186/s13756-019-0533-3>
- Sheldon, J. R., et Heinrichs, D. E. (2015). Recent developments in understanding the iron acquisition strategies of gram-positive pathogens. *FEMS Microbiology Reviews*, 39(4), 592–630. <https://doi.org/10.1093/femsre/fuv009>
- Shi, H., Huang, X., Wang, Z., Guan, Y., et Zhang, X. (2019). Improvement of pyoluteorin production in *Pseudomonas protegens* H78 through engineering its biosynthetic and regulatory pathways. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 103(8), 3465–3476. <https://doi.org/10.1007/s00253-019-09732-z>

- Shi, L., Dong, H., Reguera, G., Beyenal, H., Lu, A., Liu, J., Yu, H.-Q., et Fredrickson, J. K. (2016). Extracellular electron transfer mechanisms between microorganisms and minerals. *Nature Reviews Microbiology*, 14(10), Article 10. <https://doi.org/10.1038/nrmicro.2016.93>
- Si, M., Zhao, C., Burkinshaw, B., Zhang, B., Wei, D., Wang, Y., Dong, T. G., et Shen, X. (2017). Manganese scavenging and oxidative stress response mediated by type VI secretion system in *Burkholderia thailandensis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 114(11), E2233–E2242. <https://doi.org/10.1073/pnas.1614902114>
- Silby, M. W., Winstanley, C., Godfrey, S. A. C., Levy, S. B., et Jackson, R. W. (2011). *Pseudomonas* genomes: Diverse and adaptable. *FEMS Microbiology Reviews*, 35(4), 652–680. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2011.00269.x>
- Smith, J. L. (2004). The Physiological Role of Ferritin-Like Compounds in Bacteria. *Critical Reviews in Microbiology*, 30(3), 173–185. <https://doi.org/10.1080/10408410490435151>
- Steil, L., Serrano, M., Henriques, A. O., et Völker, U. (2005). Genome-wide analysis of temporally regulated and compartment-specific gene expression in sporulating cells of *Bacillus subtilis*. *Microbiology*, 151(2), 399–420. <https://doi.org/10.1099/mic.0.27493-0>
- Stock, A. M., Robinson, V. L., et Goudreau, P. N. (2000). Two-Component Signal Transduction. *Annual Review of Biochemistry*, 69(1), 183–215. <https://doi.org/10.1146/annurev.biochem.69.1.183>
- Stringlis, I. A., Yu, K., Feussner, K., de Jonge, R., Van Bentum, S., Van Verk, M. C., Berendsen, R. L., Bakker, P. A. H. M., Feussner, I., et Pieterse, C. M. J. (2018). MYB72-dependent coumarin exudation shapes root microbiome assembly to promote plant health. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 115(22), E5213–E5222. <https://doi.org/10.1073/pnas.1722335115>
- Sun, Y., Hürlimann, S., et Garner, E. (2023). Growth rate is modulated by monitoring cell wall precursors in *Bacillus subtilis*. *Nature Microbiology*, 8(3), Article 3. <https://doi.org/10.1038/s41564-023-01329-7>
- Tabata, R., Kamiya, T., Imoto, S., Tamura, H., Ikuta, K., Tabata, M., Hirayama, T., Tsukagoshi, H., Tanoi, K., Suzuki, T., Hachiya, T., et Sakakibara, H. (2022).

Systemic Regulation of Iron Acquisition by *Arabidopsis* in Environments with Heterogeneous Iron Distributions. *Plant and Cell Physiology*, 63(6), 842–854. <https://doi.org/10.1093/pcp/pcac049>

Thérien, M., Kiese-walter, H. T., Auria, E., Charron-Lamoureux, V., Wibowo, M., Maróti, G., Kovács, Á. T., et Beauregard, P. B. (2020). Surfactin production is not essential for pellicle and root-associated biofilm development of *Bacillus subtilis*. *Biofilm*, 2, 100021. <https://doi.org/10.1016/j.bioflm.2020.100021>

Thi, M. T. T., Wibowo, D., et Rehm, B. H. A. (2020). *Pseudomonas aeruginosa* Biofilms. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(22), Article 22. <https://doi.org/10.3390/ijms21228671>

Tian, T., Sun, B., Shi, H., Gao, T., He, Y., Li, Y., Liu, Y., Li, X., Zhang, L., Li, S., Wang, Q., et Chai, Y. (2021). Sucrose triggers a novel signaling cascade promoting *Bacillus subtilis* rhizosphere colonization. *The ISME Journal*, 15(9), Article 9. <https://doi.org/10.1038/s41396-021-00966-2>

Townsley, L., Yannarell, S. M., Huynh, T. N., Woodward, J. J., et Shank, E. A. (2018). Cyclic di-AMP Acts as an Extracellular Signal That Impacts *Bacillus subtilis* Biofilm Formation and Plant Attachment. *MBio*, 9(2), 10.1128/mbio.00341-18. <https://doi.org/10.1128/mbio.00341-18>

Trivedi, P., Leach, J. E., Tringe, S. G., Sa, T., et Singh, B. K. (2020). Plant–microbiome interactions: From community assembly to plant health. *Nature Reviews Microbiology*, 18(11), 607–621. <https://doi.org/10.1038/s41579-020-0412-1>

Troppens, D. M., Dmitriev, R. I., Papkovsky, D. B., O’Gara, F., et Morrissey, J. P. (2013). Genome-wide investigation of cellular targets and mode of action of the antifungal bacterial metabolite 2,4-diacetylphloroglucinol in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Yeast Research*, 13(3), 322–334. <https://doi.org/10.1111/1567-1364.12037>

Tsotetsi, T., Nephali, L., Malebe, M., et Tugizimana, F. (2022). *Bacillus* for Plant Growth Promotion and Stress Resilience: What Have We Learned? *Plants*, 11(19). <https://doi.org/10.3390/plants11192482>

Tsuge, K., Ano, T., Hirai, M., Nakamura, Y., et Shoda, M. (1999). The Genes degQ, pps, and lpa-8(sfp) Are Responsible for Conversion of *Bacillus subtilis* 168 to

- Plipastatin Production. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 43(9), 2183–2192. <https://doi.org/10.1128/aac.43.9.2183>
- Turner, T. R., James, E. K., et Poole, P. S. (2013). The plant microbiome. *Genome Biology*, 14(6), 209. <https://doi.org/10.1186/gb-2013-14-6-209>
- Uffen Robert L. et Canale-Parola E. (1972). Synthesis of Pulcherriminic Acid by *Bacillus subtilis*. *Journal of Bacteriology*, 111(1), 86–93. <https://doi.org/10.1128/jb.111.1.86-93.1972>
- Valderrama Katherine, Pradel Elizabeth, Firsov Alexander M., Drobecq Hervé, Bauderlique-le Roy Hélène, Villemagne Baptiste, Antonenko Yuri N., et Hartkoorn Ruben Christiaan. (2019). Pyrrolomycins Are Potent Natural Protonophores. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 63(10), e01450-19. <https://doi.org/10.1128/AAC.01450-19>
- Vandenkoornhuysen, P., Quaiser, A., Duhamel, M., Le Van, A., et Dufresne, A. (2015). The importance of the microbiome of the plant holobiont. *New Phytologist*, 206(4), 1196–1206. <https://doi.org/10.1111/nph.13312>
- Vlamakis, H., Chai, Y., Beauregard, P., Losick, R., et Kolter, R. (2013). Sticking together: Building a biofilm the *Bacillus subtilis* way. *Nature Reviews Microbiology*, 11(3), 157–168. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2960>
- Voges, M. J. E. E. E., Bai, Y., Schulze-Lefert, P., et Sattely, E. S. (2019). Plant-derived coumarins shape the composition of an *Arabidopsis* synthetic root microbiome. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 116(25), 12558–12565. <https://doi.org/10.1073/pnas.1820691116>
- Völker, C., et Wolf-Gladrow, D. A. (1999). Physical limits on iron uptake mediated by siderophores or surface reductases. *Marine Chemistry*, 65(3), 227–244. [https://doi.org/10.1016/S0304-4203\(99\)00004-3](https://doi.org/10.1016/S0304-4203(99)00004-3)
- Vorholt, J. A. (2012). Microbial life in the phyllosphere. *Nature Reviews Microbiology*, 10(12), 828–840. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2910>
- Wandersman, C., et Delepelaire, P. (2004). Bacterial Iron Sources: From Siderophores to Hemophores. *Annual Review of Microbiology*, 58(1), 611–647. <https://doi.org/10.1146/annurev.micro.58.030603.123811>

- Wang, H., Fewer, D. P., Holm, L., Rouhiainen, L., et Sivonen, K. (2014). Atlas of nonribosomal peptide and polyketide biosynthetic pathways reveals common occurrence of nonmodular enzymes. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *111*(25), 9259–9264. <https://doi.org/10.1073/pnas.1401734111>
- Wang, Y., Breedijk, R. M. P., Hink, M. A., Bults, L., Vischer, N. O. E., Setlow, P., & Brul, S. (2021). Dynamics of Germinosome Formation and FRET-Based Analysis of Interactions between GerD and Germinant Receptor Subunits in *Bacillus cereus* Spores. *International Journal of Molecular Sciences*, *22*(20), Article 20. <https://doi.org/10.3390/ijms222011230>
- Wang, Z., Schenkeveld, W. D. C., Kraemer, S. M., et Giammar, D. E. (2015). Synergistic Effect of Reductive and Ligand-Promoted Dissolution of Goethite. *Environmental Science & Technology*, *49*(12), 7236–7244. <https://doi.org/10.1021/acs.est.5b01191>
- Waqas, M., Van Der Straeten, D., et Geilfus, C.-M. (2023). Plants “cry” for help through acoustic signals. *Trends in Plant Science*. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2023.05.015>
- Wilking, J. N., Zaburdaev, V., De Volder, M., Losick, R., Brenner, M. P., et Weitz, D. A. (2013). Liquid transport facilitated by channels in *Bacillus subtilis* biofilms. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *110*(3), 848–852. <https://doi.org/10.1073/pnas.1216376110>
- Wilson, B. R., Bogdan, A. R., Miyazawa, M., Hashimoto, K., et Tsuji, Y. (2016). Siderophores in Iron Metabolism: From Mechanism to Therapy Potential. *Trends in Molecular Medicine*, *22*(12), 1077–1090. <https://doi.org/10.1016/j.molmed.2016.10.005>
- Wink, M. (1988). Plant breeding: Importance of plant secondary metabolites for protection against pathogens and herbivores. *Theoretical and Applied Genetics*, *75*(2), 225–233. <https://doi.org/10.1007/BF00303957>
- Xiao, K., Pei, K., Wang, H., Yu, W., Liang, S., Hu, J., Hou, H., Liu, B., et Yang, J. (2018). Citric acid assisted Fenton-like process for enhanced dewaterability of waste activated sludge with in-situ generation of hydrogen peroxide. *Water Research*, *140*, 232–242. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2018.04.051>
- Xu, G., Martinez, J. S., Groves, J. T., et Butler, A. (2002). Membrane Affinity of the Amphiphilic Marinobactin Siderophores. *Journal of the American Chemical Society*, *124*(45), 13408–13415. <https://doi.org/10.1021/ja026768w>

- Xu, J., et Jordan, R. B. (1988). Kinetics and mechanism of the oxidation of 2,3-dihydroxybenzoic acid by iron(III). *Inorganic Chemistry*, 27(25), 4563–4566. <https://doi.org/10.1021/ic00298a012>
- Yan, Q., Lopes, L. D., Shaffer, B. T., Kidarsa, T. A., Vining, O., Philmus, B., Song, C., Stockwell, V. O., Raaijmakers, J. M., McPhail, K. L., Andreote, F. D., Chang, J. H., et Loper, J. E. (2018). Secondary Metabolism and Interspecific Competition Affect Accumulation of Spontaneous Mutants in the GacS-GacA Regulatory System in *Pseudomonas protegens*. *MBio*, 9(1), 10.1128/mbio.01845-17. <https://doi.org/10.1128/mbio.01845-17>
- Yao, T., Liu, J., Liu, Z., Li, T., Li, H., Che, Q., Zhu, T., Li, D., Gu, Q., & Li, W. (2018). Genome mining of cyclodipeptide synthases unravels unusual tRNA-dependent diketopiperazine-terpene biosynthetic machinery. *Nature Communications*, 9(1), Article 1. <https://doi.org/10.1038/s41467-018-06411-x>
- Yuan, S., Yong, X., Zhao, T., Li, Y., & Liu, J. (2020). Research Progress of the Biosynthesis of Natural Bio-Antibacterial Agent Pulcherriminic Acid in *Bacillus*. *Molecules*, 25(23), Article 23. <https://doi.org/10.3390/molecules25235611>
- Zerriouh, H., de Vicente, A., Pérez-García, A., et Romero, D. (2014). Surfactin triggers biofilm formation of *Bacillus subtilis* in melon phylloplane and contributes to the biocontrol activity. *Environmental Microbiology*, 16(7), 2196–2211. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.12271>
- Zipfel, C. (2008). Pattern-recognition receptors in plant innate immunity. *Current Opinion in Immunology*, 20(1), 10–16. <https://doi.org/10.1016/j.coi.2007.11.003>



