



HAL
open science

Interactions *Pisum sativum* – *Pseudomonas* : conséquences sur la nutrition en fer, la croissance et l'immunité de la plante hôte

Tristan Lurthy

► **To cite this version:**

Tristan Lurthy. Interactions *Pisum sativum* – *Pseudomonas* : conséquences sur la nutrition en fer, la croissance et l'immunité de la plante hôte. Biodiversité et Ecologie. Université Bourgogne Franche-Comté, 2020. Français. NNT : 2020UBFCK022 . tel-02885113

HAL Id: tel-02885113

<https://theses.hal.science/tel-02885113v1>

Submitted on 30 Jun 2020

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

THESE DE DOCTORAT DE L'ETABLISSEMENT UNIVERSITE BOURGOGNE FRANCHE-COMTE

PREPAREE A L'UMR AGROECOLOGIE

Ecole doctorale n°554

« Environnements-Santé »

Doctorat en biologie des populations et écologie microbienne

Par

Tristan Lurthy

**Interaction pois-*Pseudomonas* :
conséquences sur la nutrition en fer, la croissance et l'immunité de
la plante hôte**

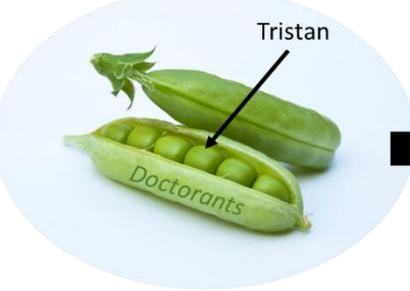
Thèse présentée et soutenue à Dijon, le 13 Mars 2020

Composition du Jury :

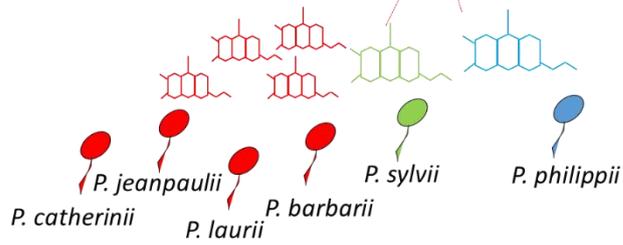
Yves DESSAUX	DR, CNRS Gif-sur-Yvette	Rapporteur
Stéphane MARI	DR, INRAE Montpellier	Rapporteur
Marie Christine CHAMPOMIER-VERGÈS	DR, INRAE Jouy-en Josas	Examinatrice
Angélique BESSON-BARD	MC, Université Bourgogne-Franche-Comté	Examinatrice
Yvan MOËNNE LOCCOZ	Pr, Université Lyon 1	Examinateur
Thierry RIGAUD	DR, CNRS Dijon	Examinateur
Sylvie MAZURIER	CR HDR, INRAE Dijon	Directrice de thèse

Président du Jury : **Thierry RIGAUD**

1 Novembre 2016
Mon arrivée à l'INRA



13 Mars 2020
Ma soutenance à l'INRA



Aidé par ses fidèles *Pseudomonas* de l'équipe IMR

Remerciements

Ce travail a été possible grâce à la participation du Conseil régional de Bourgogne et le financement ANR POSiTIF Plant2pro ainsi qu'à la bourse ministérielle attribuée par l'école doctorale environnement et santé. J'aimerais remercier l'INRA de Dijon de m'avoir accueilli dans ses locaux et qui a permis le bon déroulement de cette thèse.

Pour cette thèse mes premiers remerciements vont bien sûr à mon encadrante Sylvie qui a su m'accompagner pendant ces 3 années. Un grand merci à Sylvie pour ces bons moments scientifiques et autres : des instants pleins de valeurs à parler de sciences au début et finalement regarder des photos lorsqu'elle était « jeune chercheur », de nombreux moments à savoir comment exploiter tous ces résultats et aussi de longs moments à savoir qui était le plus têtu des 2 (*Je ne dirai pas qui a gagné 😊*). Je la remercie pour m'avoir secoué justement quand il y en avait besoin. Merci aussi à Philippe, qui malgré toutes ses responsabilités, a toujours su dégager du temps pour moi dans le but de me donner des conseils bienveillants. Je retiendrais aussi beaucoup de moments à parler vélo, thé et bien évidemment de fer dans la plante.

Je pense avoir eu énormément de chance d'évoluer avec ces deux encadrants sur un sujet aussi passionnant qu'était mon projet de thèse. C'est grâce à eux que j'ai pu acquérir autant de compétences et que j'ai pu me développer professionnellement. Et pour cela encore Merci !

L'équipe

Je n'ai pas pu réussir ces travaux de thèse sans l'aide et la bonne humeur de mon équipe d'accueil. Je remercie plus particulièrement Laure et Jean-Paul avec qui j'ai eu la chance de travailler au labo et partager 2 séjours à « Soleil » et non au soleil ! Deux semaines très intenses qui n'auraient pas pu se dérouler aussi bien sans leur bonne humeur et celle de Camille. Merci à vous deux pour votre aide : Laure pour m'avoir montré entre autres la place de tous les produits en 166 et Jean Paul pour ces longues heures à échanger de mise au point de manip et peut être un jour pour les IEF préparatifs haha.

Merci à Catherine pour m'avoir assisté sur beaucoup de manip et pour son aide tout au long de ces 3 années. Je remercie aussi Barbara pour son implication et son aide. Je remercie Florence pour sa bonne humeur, ses conseils cuisines, sa patience quand je chantais seul dans mon bureau et aussi pour son aide. Dommage qu'elle ait préféré retourner en L1 :p

Les stagiaires

Pendant ces 3 années, j'ai eu la chance d'encadrer des stagiaires qui m'ont apporté une aide précieuse pour mes manips. Merci à Halima, Jessy pour leur implication. Un grand merci à Cécile Cantat pour son excellent travail et son assistance lors des manips qui ont permis de faire avancer ce projet de thèse.

Les collègues de travail

J'aimerais aussi remercier des collègues d'autres équipes avec qui j'ai eu la chance de travailler plus spécifiquement : Merci Delphine d'avoir pris du temps pour m'expliquer l'extraction de protéines. Merci Myriam et Grégoire pour votre bonne humeur et votre patience pour m'expliquer les mystères de la génétique du pois. Merci aussi à Eric pour m'avoir transmis la recette secrète de l'extraction des pyoverdines. Merci Angélique pour tes conseils « Arabidospiques ».

Les collègues de cantine

Une thèse n'étant pas que du travail acharné, j'ai aussi eu la chance de rencontrer des personnes avec qui j'ai partagé d'agréables moments. Et le premier moment agréable d'une journée en thèse, après

le thé du matin, est le repas de midi. Merci, Elodie, Véronique, Christian pour m'avoir attendu pour manger haha et pour ces bons moments partagés.

J'aimerais particulièrement souligner la bonne humeur d'Elo et la remercier malgré sa taille pas forcément avantageuse pour le tournage vidéo sur le salon de l'agriculture. Merci également pour tes invitations BBQ et autres bouffes conviviales. Notre BIG burger restera le meilleur.

En plus du self, les repas de midi ont aussi été partagé en salle repos du 1^{er} étage. Merci Nadine et Marie Christine pour ces moments sans prise de tête à parler de tout et de rien.

Les doctorants

La thèse se partage aussi avec d'autres doctorants travaillant sur des sujets plus ou moins éloignés du notre. Je tiens à remercier tous les doctorants avec qui j'ai eu la chance de travailler via l'association des doctorants EDIFICE, via le Forum des jeunes Chercheurs 2017 et 2019. Merci aussi à ceux avec qui j'ai pu partager des bières via le « Beer time ». J'ai notamment pu rencontrer des gens merveilleux et je souhaiterais remercier plus particulièrement ceux-là à travers des anecdotes ou via les traits de caractères qui ont fait que je me suis rapproché d'eux (par ordre alphabétique pour ne pas faire de jaloux :p) : *Attention « private jokes » assurées.*

Merci à :

Aline : Un exemple de femme téméraire qui connaît le terme « efficacité » au travail ^^ . Pleins de bons moments ensemble derrière de bons petits plats, des skis et des verres de rhum.

Charles : Merci « Lieutenant Dane !! ». Mince il n'est pas doctorant. ^^

Guillaume : Un cocktail extraordinaire de nonchalance et d'humour. Des heures à parler de fleurs en marchant à tes côtés ou à essayer de te battre aux jeux de société en t'achetant avec une tarte aux fraises.

Hervé : L'exemple à suivre pour passer une bonne thèse. Tout lui paraît facile et toujours une vanne en tête. Apparemment il serait réunionnais ! haha

Karen : Des soirées, des fous rires sur des incompréhensions (« un chewing gum Karen ?? haha), des discussions d'hélicoptères, un apprentissage constant de mon niveau de Libanais linguistiquement et gastronomiquement.

Laurie : Un accent qui chante la chocolatine et le canard en toutes circonstances. Des soirées à boire des blanches et à se prendre la tête sur des débats sans sens. Bref une personne remplie de caractère, de conneries mais surtout d'affection.

Mae : Une petite femme sportive remplie de gentillesse avec qui j'ai pu partager de nombreuses heures à jouer à Katan avec une crêpe à la main en compagnie de Guillaume, Alice et Zerbib. On a aussi passé pas mal de temps à randonner dans les combes de Fixin. Je retiendrai aussi les soirées, bien sûr, un peu moins la Villa...

Marion : La fille « sauvage » toujours souriante et de bonne humeur qui te met le sourire au premier étage. J'ai pu partager plein de discussions plus ou moins sérieuses mais aussi des journées goûter/jeux de société avec Josselin, des randonnées.

Rémi : Seulement rencontré en 2^{ème} année mais les nombreuses soirées au Balta à te montrer que les crossfiteurs sont bien meilleurs que ceux qui font de la « MUSCU » nous ont quand même bien rapproché.

Simon : Le plus grand et ténébreux de la bande. Toujours partant pour une petite mousse après 10h de tamisage. Le seul avec qui le ski pouvait être une discussion haha. Pleins de bons moments dont Nice avec une grosse victoire de la France contre les argentins.

Thibault : Le breton de la bande car ils sont partout. Une origine différente mais pas mal de points communs finalement. Toujours partant pour un volley ou une soirée, notre plus gros point commun.

Zerbib : Des midis au « chez nous », des journées jeux de sociétés, des soirées, des débats scientifiques ou sur « tout et n'importe quoi », que de bons moments qui se sont finalisés pendant ta 3eme année par un congrès mémorable ensemble à Nice avec Simon.

Le crossfit

Pas possible de réaliser cette thèse sans se défouler à côté. Merci aux coachs pour m'avoir concocté d'HORRIBLES WODs, rien de mieux pour penser à autre chose. Merci à Tristan, Theo, Max, Mat', Célia, Célia, Leslie, Margot pour ces moments partagés en souffrance dans le froid, le chaud ou l'humidité et ces moments « cheat meals ». Un merci spécial pour Célia pour son assistance personnalisée remplie d'encouragements et de bons petits repas. 😊

Les amis

Je voudrais aussi remercier tous mes amis de longue date pour m'avoir permis de garder en tête que la thèse n'est pas une finalité en soi et qu'il est nécessaire de décompresser pour garder du recul. « *Comment vont tes petits pois ?!!* ». Réponse : « *ils vont bien !* » 😊

Parmi eux, merci Nane, Mag, Jo et Ni... Nico (pardon j'ai failli oublier son nom haha) pour m'avoir fait sortir de Dijon, j'aurai sûrement fait une meilleure thèse sans eux mais remplie de fautes de français.

Adrien, Yo, Max, merci à vous pour être venu me déconcentrer à Dijon pour le salon des vigneron indépendants : « *Ho Jaja !!! et la Corrèze en cathéter.... lalala!* »

Merci JB, Flo, Thom, Jean et autres Normands pour les nombreuses soirées Lyonnaises et les séjours surfs....

La famille

Je voudrais aussi remercier ma famille pour leur aide et leur accompagnement tout au long de la thèse. Merci Maman et Papa de m'avoir fait pour réaliser cette thèse 😊. Merci Frérot pour ces instants familles et convivialités autour du barbecue. Merci Tatie Annick et Tonton Daniel pour m'avoir aidé à bien m'installer sur Dijon et pour m'avoir fait de bons petits plats avec vue sur piscine. Et merci Mamie car sans toi, on ne serait pas là ^^.

En conclusion, ma thèse m'a permis de développer et optimiser les interactions entre le pois et les microorganismes mais aussi avec tous ceux avec qui j'ai travaillé et partagé des moments de convivialités. Et c'est bien grâce à tous ce mélange et cette diversité que j'ai pu réussir ma thèse donc encore MERCI !

Déforestation

***Métro, bouleau, dodo,
Travail à la chène,
Servitude hi-teck,
Multitude d'essences,
Sur le feu, une révolution,
L'élite frêne des quatre fers,
Mélèze des uns se nourrit du malheur des autres,
L'hêtre social est vraiment mal en point,
Jusqu'au jour où, ras le scie-tronc,
Du pin et des jeux pour le peuple ne suffisent plus,
Et le charme se rompt.***

Cécile Cantat, étudiante Master 2^{ème} année de 2019

Résumé

À travers cette étude, l'importance des interactions entre la plante et les microorganismes du sol liées à la dynamique du fer dans la rhizosphère a été mise en évidence (**Chapitre I**, état de l'art). Plus particulièrement, l'objectif a été de déterminer le rôle des bactéries appartenant au groupe des *Pseudomonas* spp. fluorescents et de leurs sidérophores (sids) majoritaires, les pyoverdines (pvds), dans la nutrition en fer et l'immunité du pois (*Pisum sativum*), une plante à fort intérêt en agroécologie et pour l'alimentation.

La stratégie choisie a été d'étudier l'effet de la plante sur les microorganismes et, en retour, des microorganismes sur la plante. Deux cultivars de pois, l'un sensible (S), et l'autre tolérant (T), à la chlorose ferrique ont été étudiés afin de dégager des hypothèses de la comparaison des données acquises. La pvdC7R12 modèle utilisée dans plusieurs études antérieures, et *A. thaliana*, ont également été intégrées à ce travail pour progresser dans la connaissance des mécanismes impliqués dans les interactions étudiées.

L'impact des cultivars de pois S et T a été évalué sur les microorganismes du sol et plus particulièrement sur les *Pseudomonas* spp. fluorescents de la rhizosphère et sur leurs pvds (**Chapitre II**). La diversité microbienne a été étudiée au niveau taxonomique et fonctionnel. Les deux pois ont recruté dans leur rhizosphère des *Pseudomonas* appartenant aux groupes taxonomiques *P. fluorescens*, *P. koreensis*, *P. corrugata* et *P. mandelii*. Le type de pvd le plus produit par les isolats rhizosphériques était différent selon le cultivar de pois : t (pvd1T) pour T, et d (pvd2S) pour S. De plus, les isolats issus du pois T étaient plus aptes à croître dans un milieu carencé en fer que ceux issus du pois S. Bien que faibles, des différences ont également été observées entre les communautés bactériennes totales associées à la rhizosphère des deux pois.

L'effet des microorganismes et des pvds sur la plante a été étudié à trois niveaux. Au niveau de l'organisme, il a été montré que différentes Fe-pvds peuvent impacter différemment la teneur et la répartition du fer et d'autres éléments nutritifs dans la plante ; cet impact variant avec le génotype de la plante (**Chapitre III**). Toutes les pvds étudiées possédaient des propriétés antagonistes à l'encontre d'*Aphanomyces euteiches* et des capacités à protéger la plante contre la maladie (**Ch II**). Il a également été observé que la Fe-pvd la plus favorable à la nutrition en fer pour chaque cultivar de pois était celle produite majoritairement par les isolats issus de sa propre rhizosphère. De plus, le fer apporté sous forme de Fe-pvd était plus favorable à la nutrition en fer du pois T qu'à celle du pois S. Au niveau cellulaire, les résultats obtenus à l'aide de différentes méthodes de microscopie et par spectrométrie d'absorption des rayons X (**Chapitre IV**), soutiennent l'hypothèse de l'existence d'un système non-réductif d'acquisition des complexes Fe-sid bactérien par la plante. Au niveau moléculaire, l'étude a porté sur l'effet d'apports en fer sous forme de différentes Fe-pvds ou d'un chélat chimique sur l'expression de gènes clés impliqués dans l'acquisition du fer et sa gestion *in planta*, la régulation de la balance croissance/défense, et les réactions de défense de la plante (**Chapitre V**). Les résultats obtenus ont permis d'émettre des hypothèses concernant des différences dans les stratégies d'acquisition et de gestion du fer entre un pois T et un pois S à la chlorose ferrique et selon la forme sous laquelle cet élément est apporté. Ils ont permis d'identifier des marqueurs potentiels d'une interaction entre plante et Fe-pvd favorable à la nutrition en fer.

En conclusion, les résultats obtenus sont compatibles avec le concept de génotype étendu selon lequel les microorganismes qui lui sont associés contribuent à la nutrition et à la santé de la plante et soulignent l'importance de la prise en compte du microbiote dans l'étude de la sensibilité à la carence en fer chez le pois.

Mots clés : *Pisum Sativum*, *Pseudomonas*, pyoverdines, siderophores, fer, nutrition en fer de la plante, santé de la plante, *Aphanomyces euteiches*, Interactions plante-microorganismes.

Sommaire

Abréviations

Introduction	1
1. Contexte général	2
2. Importance des légumineuses et de leur statut en fer pour la nutrition et en agroécologie .	3
3. Le fer dans les sols et sa faible disponibilité pour les organismes	6
3.1. Acquisition du fer par les microorganismes du sol	7
3.2. Acquisition et homéostasie du fer chez les plantes	10
4. Interactions plante-microorganismes en relation avec la dynamique du fer	16
5. Projet de thèse	19

Chapitre I : Importance des interactions entre la plante et son microbiote dans la biofortification en fer

23

Avant-propos	25
1. Introduction	27
2. Increasing iron availability to plants	36
3. Utilization of genetic resources to master plant iron status	42
4. Intercropping	51
5. New perspectives for iron biofortification	54
6. References	61
Bilan	75

Chapitre II : Impact du génotype de pois sur les communautés bactériennes, les *Pseudomonas* spp. fluorescents et les pyoverdines associées

77

Avant-propos	79
1. Introduction	85
2. Matériels and méthodes	90
2.1. Souches microbiennes, plantes, et conditions de cultures	90
2.2. Isolements bactériens et préparation de lysats cellulaires	91
2.3. Analyse de la structure et de la diversité des communautés bactériennes	92
2.4. Sensibilité des souches bactériennes à la carence en fer	944
2.5. Analyse du fond génétique des isolats par BOX-PCR	94
2.6. Caractérisation des pyoverdines par focalisation isoélectrique (IEF)	955
2.7. Amplifications PCR et séquençage	95

2.8.	Production des zoospores d' <i>Aphanomyces euteiches</i>	96
2.9.	Antagonisme in vitro des pyoverdines purifiées à l'encontre d' <i>A. euteiches</i>	96
2.10.	Protection du pois contre la pourriture racinaire par inoculation de souches de <i>Pseudomonas</i>	96
2.11.	Analyses des données	97
3.	Résultats	103
3.1.	Développement d'une méthode moléculaire permettant de caractériser la diversité des <i>Pseudomonas spp. fluorescents</i> et des pyoverdines correspondantes à partir d'une collection de souches de référence	103
3.2.	Etude de la diversité des <i>Pseudomonas spp. fluorescents</i> isolés de deux cultivars de pois S et T et des pyoverdines correspondantes	107
3.3.	Comparaison de la sensibilité au stress ferrique des <i>Pseudomonas</i> isolés de la rhizosphère des cultivars de pois S et T	115
3.4.	Comparaison de la diversité des communautés de <i>Pseudomonas spp. fluorescents</i> de la rhizosphère des pois S et T et des sidérophores correspondants.....	115
3.5.	Comparaison de la diversité des communautés bactériennes totales de la rhizosphère des cultivars de pois S et T	115
3.6.	Activité antagoniste de pyoverdines à l'encontre de l'agent de la pourriture racinaire (<i>Aphanomyces euteiches</i>) et protection des cultivars de pois S et T contre la maladie par les souches qui les produisent.....	117
4.	Discussion	119
4.1.	Développement d'une méthode moléculaire de caractérisation de la diversité des <i>Pseudomonas spp. fluorescents</i> et des pyoverdines correspondantes	119
4.2.	Comparaison de la diversité des <i>Pseudomonas spp. fluorescents</i> isolés des deux cultivars de pois S et T et des pyoverdines correspondantes.....	122
4.3.	Comparaison de la sensibilité au stress ferrique des <i>Pseudomonas</i> isolés de la rhizosphère des cultivars de pois S et T	123
4.4.	Comparaison de la diversité des communautés de <i>Pseudomonas spp. fluorescents</i> de la rhizosphère des pois S et T et des sidérophores correspondants.....	123
4.5.	Comparaison de la diversité des communautés bactériennes totales de la rhizosphère des cultivars de pois S et T	124
4.6.	Activité antagoniste de pyoverdines à l'encontre de l'agent de la pourriture racinaire (<i>Aphanomyces euteiches</i>) et protection des cultivars de pois S et T contre la maladie par les souches qui les produisent.....	124
5.	Conclusions	126
6.	Références	127
	Résultats complémentaires	135
	Bilan	135

Chapitre III : Impact de sidérophores bactériens sur le statut en fer et le ionome du pois..... 139

Avant-propos	141
1. Abstract	143
2. Introduction	145
3. Materials and methods.....	147
3.1. Microbial strains and culture conditions	147
3.2. Pyoverdine purification and Ferri-pyoverdine preparation	147
3.3. Plant growth conditions and sampling	149
3.4. Determination of the ionic composition of pea plants	150
3.5. Extraction, separation and relative quantification of seed proteins.....	150
3.6. Data analyses.....	151
4. Results	153
4.1. Pea growth, seed yield, iron concentration, ionome in S and T cultivars cultivated under field conditions	153
4.2. Impact of ferrisiderophores on pea growth, development, iron content and ionome in S and T cultivars	155
4.3. Impact of <i>Pseudomonas</i> C7R12 and its pyoverdine-minus mutant on pea growth, development, iron content and ionome in S and T cultivars	161
5. Discussion	163
6. Author contributions	166
7. Acknowledgements	167
8. References	168
Bilan.....	173

Chapitre IV : Etude du statut en fer et de la morphologie des cellules racinaires d'*Arabidopsis thaliana* en présence d'un ferrisidérophore bactérien 177

Avant-propos	179
1. Abstract	181
2. Introduction	183
3. Materials and methods.....	185
3.1. Production and purification of pyoverdine	185
3.2. Plant material, growth conditions and sampling	185
3.3. Iron content in roots and shoots.....	187
3.4. Root ferric reductase activity	189
3.5. Transmission Electron Microscopy.....	189

3.6. Samples preparation for nanoscale secondary ion mass spectrometry (NanoSIMS) analysis	191
3.7. Immunoelectron microscopy (IEM).....	193
3.8. X-ray absorption spectroscopy (XAS)	193
3.9. Statistical analyses.....	197
4. Results	199
4.1. Effect of Fe(III)-pvd and Fe(III)-EDTA on plant iron content and root ferric reductase activity	199
4.2. Effect of Fe(III)-pvd and Fe(III)-EDTA on root ultrastructure and presence of vesicles... ..	199
4.3. Localization of pyoverdine and of Fe(III)-pvd in plants supplemented with the iron chelate.....	199
5. Discussion	206
6. Acknowledgments:.....	209
7. References	210
Bilan.....	215

Chapitre V : Impact de différentes pyoverdines de *Pseudomonas* spp. fluorescents sur l'expression de gènes impliqués dans la nutrition en fer et l'immunité du pois..... 217

Avant-propos	219
1. Introduction.....	221
2. Matériels et méthodes	226
2.1. Plantes et conditions de culture.....	226
2.2. Purification et préparation des sidérophores	227
2.3. Analyses multiélémentaires	227
2.4. Génomique translationnelle et conception d'amorces pour la RT qPCR	228
2.5. Extraction des ARN, synthèse des ADN complémentaires (ADNc) par transcription réverse (RT) et PCR quantitative (qPCR).....	228
2.6. Immunodetection des ferritines.....	229
2.7. Analyses statistiques et traitement des données	229
3. Résultats.....	233
3.1. Génomique translationnelle.....	233
3.2. Expression de gènes	233
3.3. Abondance des ferritines et concentration en fer dans les plantes	259
4. Discussion	261
5. Références	270
Bilan.....	275

Conclusions générales et perspectives.....	277
1. Développement d'outils	278
2. Effets de la plante sur les microorganismes	280
3. Effets des microorganismes sur la plante	282
4. Conclusion	285
Références	287
Curriculum Vitæ	295
Annexes.....	298

Abréviations

ADN	Acide désoxyribonucléique	pHi	Point isoélectrique
ABA	Abscisic acid	pois S	Pois sensible à la chlorose ferrique
AHA	<i>Arabidopsis</i> H ⁺ -ATPase	pois T	Pois tolérant à la chlorose ferrique
ARN	Acide ribonucléique	PR4	Pathogenesis-related protein 4
AUDPC	Area under the disease progress curve	PRE1	Paclobutrazol-resistant 1
bHLH	Basic helix-loop-helix	PS	Phytosiderophore
CAA	Casamino acid	pvd	Pyoverdine
CMA	Corn meal agar	r.p.m	Rotation par minute
CMI	Concentration minimale inhibitrice	SA	Salicylic acid
DFOB	Desferrioxamine B	UMR	Unité mixte de recherche
DO	Densité optique	UV	Ultra violet
Et	Ethylene	VOC	Composé organique volatil
FAO	Food and agriculture organization	YS/YSL	Yellow stripe/yellow stripe like
Fe²⁺	Fer ferreux	ZIP	Zinc-regulated transporter IRT-like proteins
Fe³⁺	Fer ferrique		
FIT	FER-like induced transcription factor		
FEP1	Fe-uptake-inducing peptide 1		
FPC	Fluorescent phenolic compounds		
FRO	Ferric-chelate reductase oxidase		
GA	Gibberellin		
HBI1	Homolog of bee2 interacting with IBH1		
IAA	Indole-3-acetic acid		
IDC	Iron deficiency chlorosis		
IEF	Isoélectrofocalisation		
IMA3	Iron man 3		
IRT	Iron related transporter		
ISR	Induced systemic resistance		
JA	Jasmonic acid		
MS	Spectrométrie de masse		
NA	Nicotianamine		
NAS	Nicotianamine-synthases		
NO	Nitric oxide		
NRAMP	Natural resistance associated macrophage protein		
NRPS	Non-ribosomal peptides synthetase		
OMS	Organisation mondiale de la santé		
ONU	Organisation des nations unies		
PCR	Polymerase chain reaction		
PDR9	Pleiotropic drug resistance 9		

Introduction

1. Contexte général

La population mondiale est passée de 3 milliards à 7,6 milliards d'habitants en environ 60 ans (de 1960 à 2018) et il est estimé qu'elle pourrait atteindre 9,8 milliards en 2050 et 11,2 milliards en 2100 (ONU, 2019). Cette croissance démographique s'accompagne d'une augmentation des demandes en nourriture. Depuis le début des années 1950, l'un des objectifs de l'agriculture est de répondre à cette demande. Néanmoins, de nombreuses personnes sont victimes de malnutrition et une proportion grandissante de la population mondiale souffre de carences nutritives notamment vis-à-vis du fer, du zinc, du cuivre et/ou de l'iode (World Health Organization, 2018). La carence en fer (anémie ferriprive) est la première cause de carence en micronutriments dans le monde (FAO, 2018; World Health Organization, 2018). Le manque de fer touche les pays en voie de développement dont la population a, en général, peu accès à l'alimentation carnée qui constitue la plus importante source de fer. La carence en fer touche aussi les pays développés et plus particulièrement les femmes enceintes et les enfants (FAO, 2018). Elle a de graves et nombreuses conséquences sur la santé humaine, le fer étant un microélément qui intervient dans de nombreuses réactions du vivant (respiration cellulaire, transport de l'oxygène...). L'anémie ferriprive mène notamment à une baisse des performances physiques, du système immunitaire et cognitives (perte de l'attention, baisse de la mémoire et de la compréhension) (FAO, 2018).

L'augmentation des carences en fer est en grande partie due à une agriculture non diversifiée (Dwivedi et al., 2017; Wakeel et al., 2018). De plus, le développement des monocultures et la plus faible utilisation des systèmes de rotation ont facilité au cours des années l'émergence et la stabilisation de maladies ayant des impacts négatifs sur les rendements (Shipton, 1977). Les variétés cultivées ont été sélectionnées pour leur rendement et leur capacité à se développer en présence de nombreux amendements (N, P, K, S) menant par exemple chez le blé à une baisse de la teneur en microéléments (Fan et al., 2008). Cela a été fait au dépend de la sélection de cultivars présentant de forte teneur en microéléments et en vitamines (vitamine A) (Dwivedi et al., 2017).

2. Importance des légumineuses et de leur statut en fer pour la nutrition et en agroécologie

Les légumineuses sont un groupe de plantes dicotylédones correspondant à la famille des Fabaceae. Les légumineuses regroupent de nombreuses cultures importantes de plantes fourragères ou encore de plantes produisant des graines et des légumes verts essentiels à l'alimentation (trèfles, luzernes, soja, haricots, pois, lentille, pois chiche, fèves, féveroles...). La culture des plantes de cette famille présente un grand intérêt pour l'alimentation humaine et animale en raison de la teneur élevée en acides aminés et en micronutriments de leurs graines (Burstin et al., 2011).

Le développement de la culture des légumineuses est essentiel pour diversifier les sources de protéines dans l'alimentation humaine afin de permettre un apport en microéléments, et notamment en fer, suffisant pour les populations n'ayant pas ou peu accès à l'alimentation carnée. De plus, le remplacement, au moins en partie, des protéines d'origine animale par des protéines végétales apparaît nécessaire pour limiter l'impact de l'élevage sur l'environnement. Cependant le développement de la part de protéines végétales dans l'alimentation humaine nécessite une amélioration de la qualité nutritionnelle des graines et, en particulier, une hausse de la teneur en fer et une baisse des facteurs antinutritionnels (phytates,...) qui limitent l'assimilation de cet élément.

Le développement de la culture des légumineuses présente également un grand intérêt pour le développement de l'agroécologie. Ces plantes sont capables d'utiliser l'azote atmosphérique via des symbioses racinaires établies avec des bactéries collectivement désignées par le terme de rhizobias (van Rhijn and Vanderleyden, 1995). La fixation biologique de l'azote atmosphérique permet de fortement limiter l'utilisation des engrais azotés qui ne sont pas nécessaires pour la culture d'une légumineuse ayant établi une symbiose efficace (Drinkwater et al., 1998). De plus, l'emploi d'intrants azotés peut être fortement diminué voire évité dans une rotation à la suite de la culture d'une légumineuse et par le développement de systèmes de cultures associées entre une légumineuse et une non-légumineuse (par exemple pois-blé, soja-avoine...) (Duchene et al., 2017).

Différents problèmes sont rencontrés dans la culture des légumineuses et peuvent limiter leur développement. Ces problèmes peuvent être dus au développement d'agents



Figure 1. Symptômes modérés de chlorose ferrique (IDC, iron deficiency chlorosis) sur des pois protéagineux : jaunissement des feuilles jeunes de l'apex autour des nervures

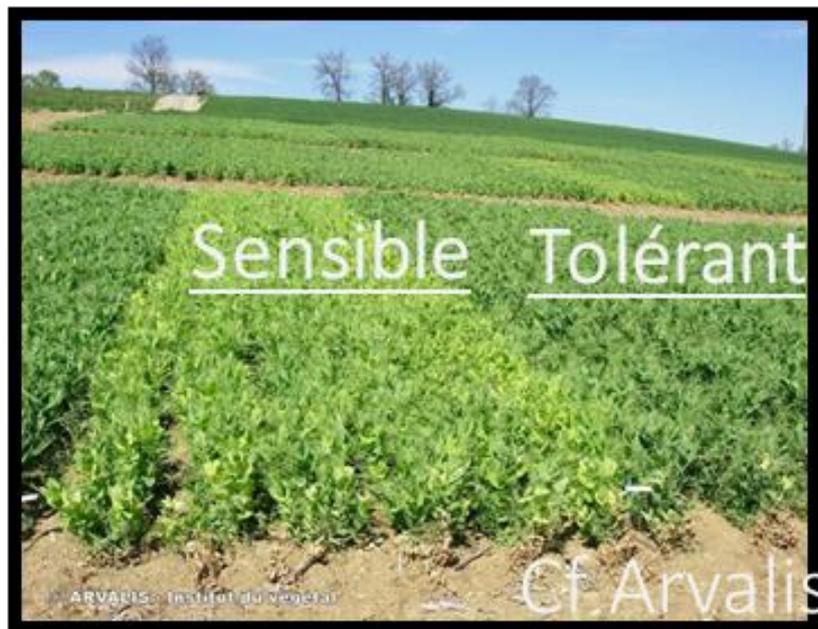


Figure 2. Cultivars de pois présentant une sensibilité différente à la chlorose ferrique (Photo Arvalis).

phytopathogènes ou de parasites. Par exemple, l'oomycète *Aphanomyces euteiches* est responsable de pourriture racinaire sur de nombreuses légumineuses et la gravité de la maladie peut varier en fonction des espèces (Gaulin et al., 2007). Un autre problème important rencontré dans la culture des légumineuses est leur sensibilité à la carence en fer en particulier quand elles sont cultivées dans des sols carbonatés (calcaires). Ce problème, rencontré aussi pour d'autres cultures, est d'autant plus important pour les légumineuses que ces cultures ont besoin d'une grande quantité de fer pour le bon fonctionnement de la symbiose fixatrice d'azote atmosphérique (Brear et al., 2013). En effet dans les nodosités des légumineuses, le fer est essentiel pour le bon fonctionnement de la nitrogénase qui est la métalloenzyme permettant de réduire l'azote atmosphérique N_2 en ammoniac NH_3 . De plus, l'activité de la nitrogénase est très sensible à la présence d'oxygène, par conséquent les légumineuses utilisent aussi les leghemoglobines, contenant du fer (hème), pour séquestrer l'oxygène (Brear et al., 2013).

En conditions de carence en fer, les plantes développent des symptômes de chlorose ferrique : IDC (Induced deficiency chlorosis) (**Figure 1**) qui peuvent conduire à de fortes pertes de rendement et à une diminution de la teneur en fer des récoltes (Briat et al., 2015). L'IDC est la conséquence d'une perte de chlorophylles dans les feuilles causée par une baisse de la teneur en fer de la plante. Cependant il existe une hétérogénéité de tolérance à la carence en fer chez les légumineuses (Gildersleeve and Ocumpaugh, 1989; Mahmoudi et al., 2009; Helms et al., 2010). Le pois est concerné par cette hétérogénéité et différents cultivars de pois peuvent présenter une tolérance à l'IDC variable (**Figure 2**) (Zribi and Gharsalli, 2002; Yakop, 2012; Ahmed et al., 2015).

Le pois est cultivé à la fois pour la production de fourrage et de graines fraîches ou sèches. C'est la deuxième culture de graines de légumineuses après le haricot avec 16.2 mégatonnes (Mt) de pois sec et 20.6 Mt de pois frais produites dans le monde en 2017 (FAOSTAT, 2017). Après les années 1990, la culture du pois a chuté (**Figure 3**). Depuis les années 2010, la production globale de pois a augmenté de nouveau dans le monde (**Figure 3**). L'écart grandissant de la production de pois frais entre le monde et l'Europe souligne un désintéressement de l'Europe pour cette culture (**Figure 3**). En revanche la culture du pois sec et notamment celle des pois protéagineux, a également repris.

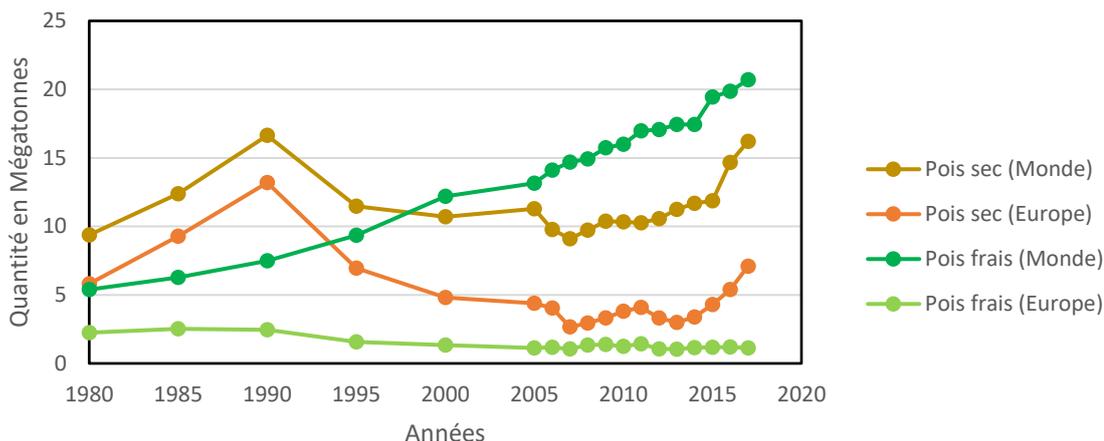


Figure 3. Evolution de la production de pois dans le monde et en Europe entre 1980 et 2017 (FAOSTAT, 2017)

Le développement de la culture du pois en Europe est important pour limiter les importations de protéines destinées à l'alimentation animale actuellement trop importantes, pour l'alimentation humaine, et pour le développement de l'agroécologie (Dahl et al., 2012). L'optimisation de la nutrition en fer et de la santé du pois sont nécessaires à l'extension de sa culture et à l'amélioration de la qualité des récoltes. Par ailleurs, l'UMR Agroécologie de Dijon bénéficie d'une expertise reconnue dans les domaines de la génétique et de l'écophysiologie des légumineuses et en particulier du pois. L'ensemble de ces éléments a motivé le choix de cette plante pour mon projet de thèse.

3. Le fer dans les sols et sa faible disponibilité pour les organismes

Les microorganismes hétérotrophes du sol ont basé leur métabolisme énergétique sur des échanges entre donneurs d'électrons (composés organiques,...) et accepteurs d'électrons (fer ferrique Fe^{3+} , oxygène,...)(Robin et al., 2008). Dans les sols, la proportion de donneurs d'électrons est bien plus élevée que la proportion d'accepteurs d'électrons engendrant une forte compétition pour ces derniers (Robin et al., 2008). Parmi les accepteurs d'électrons se trouve le fer, un métal dit de transition. La structure électronique du fer permet des changements réversibles de niveau d'oxydation et lui confère un fort potentiel redox essentiel dans les nombreux processus biologiques où il est impliqué (Guerinot and Yi, 1994). La compétition pour le fer entre organismes du sol est forte mais sa cause n'est pas un problème

d'abondance. Le sol est un environnement complexe où le fer est présent en grande quantité et sous différentes formes (Fe^{2+} , Fe^{3+} , oxydes de fer, hydroxydes de fer...) (Robin et al., 2008). C'est le quatrième élément le plus présent dans la croûte terrestre après l'oxygène, le silicium et l'aluminium. Dans les sols, le stock de fer est présent sous 3 formes majeures : (i) incorporé dans des minéraux primaires et secondaires, (ii) sous forme soluble et (iii) sous forme complexée à la matière organique (Cornell and Schwertmann, 2003). Dans les conditions de pH et de potentiel redox compatibles avec la culture des plantes, le fer ferrique (Fe^{3+}) est majoritairement précipité sous forme d'hydroxydes, d'oxyhydroxydes et d'oxydes alors que le fer ferreux (Fe^{2+}) est principalement intégré dans des cristaux de fer-magnésium primaires et secondaires (Cornell and Schwertmann, 2003). Du fait de la faible solubilité des oxydes de fer, la concentration en fer disponible dans les sols est très basse. Par conséquent, c'est la faible biodisponibilité du fer dans les sol qui est le déterminant majeur de la forte compétition entre les organismes vivants pour cet élément (Robin et al., 2008; Lemanceau et al., 2009). La biodisponibilité du fer est définie par Harmsen et al. (2005) comme la proportion totale de fer pouvant être facilement assimilée par les organismes vivants. Cette biodisponibilité du fer dans les sols est directement dépendante du pH et du potentiel redox du sol : plus le pH d'un sol est alcalin plus la disponibilité du fer diminue. Le pH est quant à lui influencé par la capacité tampon des sols et notamment par la proportion de carbonate (calcaire). Les sols carbonatés, dans lesquels le fer est très peu biodisponible, représentent une proportion importante, environ 30%, des sols dans le monde (Chen and Barak, 1982).

3.1. Acquisition du fer par les microorganismes du sol

Le fer étant peu disponible dans les sols, les microorganismes ont développé des stratégies actives d'acquisition. L'une des stratégies est l'acidification par extrusion de protons (H^+) qui augmente la solubilité du fer et donc sa biodisponibilité. Cette acidification peut aussi être liée à d'autres activités microbiennes comme la nitrification ou à la solubilisation du phosphate (Jin et al., 2014). Certaines bactéries sont dotées d'un système d'acquisition du fer ferreux Fe^{2+} (FEO). Ce système d'acquisition est généralement associé à des microorganismes vivant dans des environnements anaérobies (Sandy and Butler, 2009). Une autre stratégie d'acquisition du fer est la production de molécules chélatrices, les sidérophores. La synthèse de sidérophores est l'une des stratégies d'acquisition du fer la plus répandue chez les

microorganismes ; c'est aussi la plus efficace. Les sidérophores microbiens sont de petites molécules ayant une forte affinité pour le fer. Le fer de l'environnement est chélaté et le complexe fer-sidérophore est ensuite récupéré par des protéines membranaires spécifiques permettant leur import dans la cellule (Cornelis, 2010). Cette stratégie est à la fois utilisée par les champignons et les bactéries. Les sidérophores possèdent une très forte affinité pour le fer ferrique Fe^{3+} (Albrecht-Gary et al., 1994). L'affinité des sidérophores pour le fer varie beaucoup. Certains sidérophores comme l'entérobactine peuvent présenter des affinités extrêmement fortes pour le fer avec une constante d'affinité égale à $10^{49} M^{-1}$ (Hay et al., 2001). La taille des sidérophores microbiens est aussi très variable allant de 500 à 2500 Daltons. Les sidérophores microbiens sont généralement décrits sur la base des groupements fonctionnels qui lient le fer (Aznar and Dellagi, 2015). Les trois classes majoritaires sont les catécholates (qui incluent aussi les phénolates), les hydroxamates et les carboxylates (**Figure 4**). Les sidérophores microbiens ont été beaucoup étudiés au cours de ces dernières années et plus de 500 types différents ont été dénombrés (Hider and Kong, 2010).

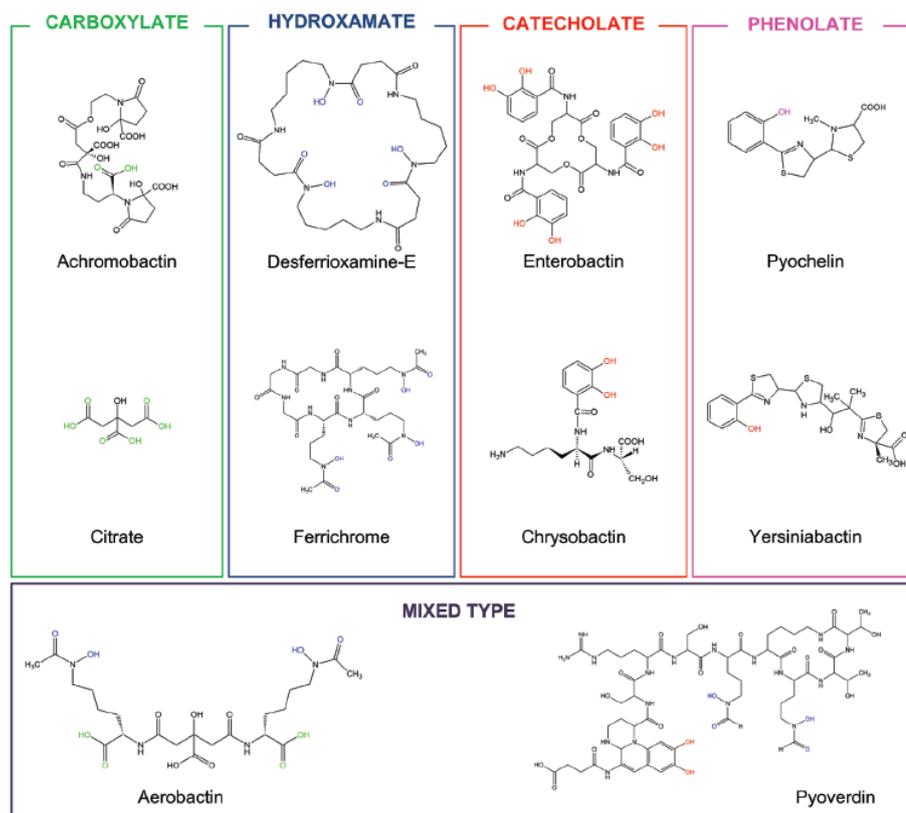


Figure 4. Exemple des différents types de sidérophores classés selon leurs groupements fonctionnels (Aznar & Dellagi, 2015).

Le travail de thèse présenté est plus particulièrement centré sur un type de sidérophore, la pyoverdine (pvd). Cette molécule fluorescente sous UV est produite par certains *Pseudomonas* regroupés sous le terme de « *Pseudomonas* spp. fluorescents ». Plus de 100 pyoverdines ont été caractérisées (Budzikiewicz, 2004; Cézard et al., 2015). Un des premiers travaux rapportant l'existence des pyoverdines date de 1892 (Gessard, 1892). A l'époque, ce pigment jaune-vert excrété par les *Pseudomonas* fût nommé fluorescine. Le rôle des pyoverdines dans l'acquisition du fer a été découvert par Meyer and Abdallah (1978). La première structure chimique a été observée par une méthode de spectrométrie par Briskot et al. (1989) sur *P. aeruginosa*. La couleur jaune-verte de la molécule fut associée à la molécule non chélatée au fer appelée aussi apo-pyoverdine et lors de la chélation du fer, un changement de couleur du jaune-vert au marron est observable (Folschweiller et al., 2002).

Les pyoverdines sont constituées de 3 parties (Cézard et al., 2015) :

- Un chromophore responsable de la fluorescence et dérivé de la 2,3-diamino-6,7-dihydroxyquinoline. Le chromophore est stable et conservé chez les espèces de *Pseudomonas*. Il permet la liaison avec le fer grâce à sa fonction catéchol.
- Une chaîne latérale formée par un groupement acyle dérivé d'un acide dicarboxylique. Elle peut varier et prendre une forme succinate, amine, amide, malate, glutamate ou α -cétoglutarate.
- Une chaîne peptidique linéaire ou cyclique très variable responsable de la spécificité d'incorporation de la molécule. La chaîne peut être composée de 6 à 14 acides aminés liés au chromophore par son groupe carboxyle et interagit avec le Fe^{3+} grâce à deux fonctions hydroxamate et/ou α -hydroxycarboxylate.

La chaîne peptidique est l'élément important dans le processus de reconnaissance spécifique de la molécule par les transporteurs membranaires microbiens responsables de son internalisation (Hartney et al., 2013). Elle comporte des acides aminés rares non-protéinogènes (non utilisés lors de la traduction des ARN) comme l'acide β -hydroxyaspartique (Asp), β -hydroxyhistidine (His), acide 2,4-diaminobutyrique (Dab), ornithine (Orn), cyclo-*N*-hydroxyornithine (cOrn), *N*-formyl-*N*-hydroxyornithine (FoHOOrn), *N*-acétyl-*N*-hydroxyornithine (AcHOOrn) and *N*-hydroxybutyryl-*N*-hydroxyornithine (Cézard et al., 2015).

3.2. *Acquisition et homéostasie du fer chez les plantes*

Un manque de fer, micronutriment indispensable à de très nombreuses réactions du métabolisme, limite gravement le développement des plantes. Une part d'énergie importante est donc investie dans les mécanismes actifs d'acquisition de cet élément. Mais le caractère redox-actif du fer le rend aussi toxique lorsqu'il est présent en trop grande quantité. Il peut être à l'origine de la formation de formes actives de l'oxygène qui peuvent gravement endommager les cellules (ROS, Reactive oxygen species) via la réaction de Fenton (Winterbourn, 1995). Une part importante d'énergie est donc aussi investie dans la régulation des équilibres des différentes formes de fer présentes *in planta*. Le terme homéostasie a été proposé par Cannon (1929) pour définir ce type de régulation. Il décrit le maintien de l'état basal d'un élément dans un organisme approximativement à un niveau constant et stable où des variations peuvent se produire mais uniquement dans certaines limites.

Acquisition du fer

Les plantes ont développé différentes stratégies actives d'acquisition du fer parmi lesquelles les stratégies I et II qui ont fait l'objet de très nombreuses études (Curie and Briat, 2003; Connorton et al., 2017). La stratégie I est utilisée par les dicotylédones et les monocotylédones non-graminées. Elle consiste en l'acidification du milieu via une pompe à proton membranaire (chez *Arabidopsis* *AHA2* pour *Arabidopsis* H^+ -ATPase). Cette acidification de la rhizosphère facilite la dissolution du fer immobilisé et la libération de Fe^{3+} . Les ions Fe^{3+} sont ensuite réduits en Fe^{2+} par des réductases ferriques codées par des gènes *FRO* (Ferric-chelate Reductase Oxidase ; *FRO2* chez *Arabidopsis*). Les ions Fe^{2+} sont finalement internalisés via des transporteurs membranaires codés par des gènes *IRT* ou *RIT* (Iron-Regulated Transporter ; *IRT1* chez *Arabidopsis*). Les systèmes membranaires IRT font partie de la famille des transporteurs ZIP (Zinc-regulated transporter IRT-like Proteins) et ne sont pas spécifiques du fer. D'autres métaux divalents comme le zinc (Zn^{2+}), le manganèse (Mn^{2+}) ou le cadmium (Cd^{2+}) peuvent être transportés par IRT (Kim and Guerinot, 2007).

Même si la majorité des études sur les systèmes d'acquisition du fer chez les plantes est restée longtemps focalisée sur les stratégies I et II d'acquisition du fer, un autre mécanisme a été décrit plus récemment. Des études ont montré l'implication d'un transporteur membranaire, *PDR9* (Pleiotropic Drug Resistance 9 ; aussi appelé *ABCG37*, *ATP Binding*

Cassette G37) dans l'amélioration de la nutrition en fer en conditions de carence chez *Arabidopsis* via la sécrétion de composés phénoliques appartenant à la famille des coumarines (**Figure 5**) (Fourcroy et al., 2014; Schmid et al., 2014). Les coumarines sécrétées faciliteraient la dissolution et la mobilisation du fer par chélation et participeraient à la réduction du Fe^{3+} en Fe^{2+} (Schmid et al., 2014; Fourcroy et al., 2016; Tsai and Schmidt, 2017). Par ailleurs, Jin et al. (2007) ont montré que des composés phénoliques sécrétés par des racines de trèfle incarnat étaient impliqués dans la remobilisation du fer de l'apoplasme. L'apoplasme représenterait une source importante de fer en condition de carence chez les plantes (Bienfait et al., 1985; Curie et Mari, 2017).

La stratégie II d'acquisition du fer est utilisée par les monocotylédones graminées (famille des Poaceae) et repose sur la chélation du fer par des phytosidérophores. Ces derniers chélatent le fer et permettent sa mobilisation vers la plante. Les phytosidérophores excrétés par les graminées sont de petites molécules (acides muginéiques comme par exemple l'acide déoxymuginéique) ayant une forte affinité pour le fer (**Figure 5**). La synthèse de ces phytosidérophores utilise la nicotianamine comme précurseur (Clemens, 2019). Le complexe fer-phytosidérophore est internalisé via un transporteur membranaire du type YS/YSL (Yellow Stripe/Yellow Stripe Like) (Curie et al., 2001; Curie et al., 2009).

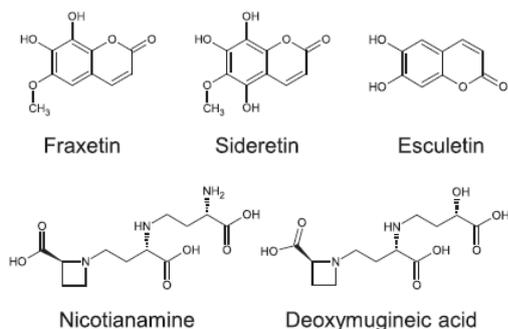


Figure 5. Exemple de ligands du fer excrétés par les plantes. Ligne du haut, 3 types de coumarines impliquées dans l'acquisition du fer des plantes. Ligne du bas, phytosidérophores dérivés de la S-adenosyl-L-méthionine (Tiré de Clemens, 2019).

La barrière entre stratégie I et stratégie II n'est pas si exclusive. Il a été montré que le riz (stratégie II), pouvait internaliser les ions ferreux Fe^{2+} via un transporteur de type IRT (Ishimaru et al., 2006). De plus, le complexe Fe-phytosidérophore du maïs, plante de stratégie II, pourrait être internalisé par une plante de stratégie I, la cacahuète, via un transporteur de la famille

des YSL (Xiong et al., 2013). Certaines fonctions dans la nutrition en fer de la plante se trouvent être codées par des gènes bien spécifiques de chacune des deux stratégies (ex : *FIT* code un régulateur clé chez les plantes de stratégie I absent chez celles de stratégies II). Mais les deux stratégies semblent être plus proches qu'on ne le pensait il y a quelques années et les fonctions de nombreux gènes s'avèrent être communes aux deux stratégies (Grillet et Schmidt, 2019).

Homéostasie du fer et transport

La présence du fer dans la cellule sous ses formes réactives doit être circonscrite à l'écart des organites et des réactions métaboliques où sa quantité doit être parfaitement régulée. En conséquence cet élément est essentiellement présent dans les cellules dans la vacuole ou sous des formes complexées inactives pour son stockage ou son transport (Curie et al., 2009; Kobayashi and Nishizawa, 2012; Clemens, 2019). Une fois internalisé dans les cellules racinaires sous forme Fe^{2+} via les transporteurs du type IRT1 ou d'un complexe Fe-phytosidérophore (Fe^{3+} -PS) via YS/YSL, le fer doit atteindre les vaisseaux conducteurs pour être transporté jusqu'aux organes puits. Chez les plantes de nombreux composés ont été décrits comme ayant la capacité de se lier aux métaux et notamment au fer. La liste des ligands résumée dans le travail de Clemens *et al.* (2019) est présentée dans le **Tableau 1**.

Tableau 1 : Liste des différents ligands de métaux potentiellement utilisés par la plante. (Modifié d'après les travaux de Clemens et al., 2019).

Type de composé	Exemple de ligand	Stratégie
S-adenosyl-L-méthionine	Acides muginéiques	II
	Nicotianamine	I et II
Phénylpropanoïdes	Coumarines : flaxétine, siderétine et esculine	I
Thiols	Glutathione	I et II
	Cystéine	I et II
Acides organiques	Citrate	I et II
	Malate	I et II
	Oxalate	I et II
	Phytate	I et II
Acides aminés	Asparagine, Aspartate, Glutamine, Phénylalanine, Tryptophane et Histidine	I et II

Des cellules de l'épiderme racinaire jusqu'aux vaisseaux conducteurs de la stèle, le fer migre par la voie symplasmique (de cellule à cellule) via les plasmodesmes selon son gradient de concentration. Dans le symplasme, le fer est considéré comme étant principalement complexé à la nicotianamine (NA), Fe^{2+} -NA; la NA étant synthétisée par des nicotianamine-synthases codées par des gènes *NAS* (par exemple *NAS4* chez *Arabidopsis*) (Curie et al., 2009). Le fer peut aussi migrer par voie apoplastique (entre les cellules). Le transport par voie apoplastique du fer est bloqué au niveau de la bande de Caspary, barrière imperméable formée d'un anneau de cellules à paroi fortement subérisée, qui oblige le transfert des ions vers le symplasme pour atteindre la stèle (Connorton et al., 2017).

Au niveau de la stèle, le fer est chargé dans les vaisseaux du xylème par voie apoplastique. Du fait du faible pH de la sève brute (généralement pH = 5,5), la stabilité du complexe Fe^{2+} -NA est limitée. Le citrate deviendrait donc le chélateur majoritaire du fer dans le xylème (Rellán-Alvarez et al., 2008). En revanche, la sève élaborée ayant un pH plus neutre voire légèrement alcalin, la NA deviendrait de nouveau le chélateur majoritaire du fer dans le phloème (Connorton et al., 2017). Il est important de noter que la NA transporte également des quantités non négligeables de Cu^{2+} , Zn^{2+} et Mn^{2+} présents dans le phloème (Harris et al., 2012). Les gènes codant les *NAS*, et en particulier chez *Arabidopsis* le gène *NAS4*, sont indispensables à la réponse adaptative à la carence en fer (Koen et al., 2013).

Homéostasie du fer, stockage et remobilisation

Au niveau cellulaire, le fer est présent en quantité au niveau des mitochondries et des plastes pour être utilisé dans la respiration cellulaire et la photosynthèse. Les chloroplastes contiendraient environ 80% du fer présent dans les cellules foliaires (Nouet et al., 2011). Le fer importé dans les plastes et les mitochondries peut être stocké sous forme de complexes avec les ferritines (Darbani et al., 2013). Les ferritines sont des protéines résultant de l'assemblage de 24 sous-unités, formant une sphère dont la cavité est capable de stocker jusqu'à 4500 atomes de fer (Kim and Guerinot, 2007). Les proportions de fer stocké sous forme de ferritine varient entre les espèces végétales. Les graines de pois et d'arabette contiennent par exemple respectivement 60% et 5% de fer sous forme de ferritine (Zielinska-Dawidziak, 2015). Il existe quatre isoformes de ferritine, FER1 à FER4. En fonction de son stade de développement et des différents signaux environnementaux, la plante exprimera préférentiellement une isoforme plutôt qu'une autre (Briat et al., 2010). Par exemple, en

présence de fer en excès, la forme principalement induite chez *A. thaliana* est AtFER1 (Ravet et al., 2009). Les quatre formes de ferritine sont retrouvées dans les plastes mais AtFER4 présente la particularité d'être également retrouvée dans les mitochondries (Jain and Connolly, 2013). AtFER4 et AtFER1 semblent de plus jouer un rôle particulier dans la réponse au stress oxydatif. En effet, ces deux ferritines sont induites par l'oxyde nitreux (NO), un puissant antioxydant protégeant les cellules du stress oxydatif. Chez les mutants AtFER4 d'*Arabidopsis* les réponses au stress oxydatif ont une intensité plus faible que celle enregistrée pour le génotype sauvage (Jain and Connolly, 2013).

D'importantes quantités de fer sont aussi stockées dans la vacuole. Différents transporteurs ont été décrits chez *A. thaliana* comme potentiellement associés au transfert du fer depuis le cytosol vers la vacuole IRT2 un homologue d'IRT1 (Iron-Regulated Transporter 2), VIT1 (Vacuolar Iron Transporter), IREG2 (Iron-Regulated 2) (Agafonov et al., 2016). Le fer doit pouvoir être remobilisé depuis ce compartiment en fonction des besoins. Cette fonction est assurée par des transporteurs de la famille protéique NRAMP (Natural Resistance Associated Macrophage Protein). Lors d'une carence, le fer est déstocké; l'expression des gènes *NRAMP3* et *NRAMP4* est induite (Lanquar et al., 2005), tandis que celle de *FER1* et *FER4* est réduite (Waters et al., 2012).

Homéostasie du fer et régulation

Parmi les systèmes moléculaires impliqués dans la perception du statut en fer et dans sa régulation, on trouve de nombreux facteurs de transcription. Un ensemble de protéines bHLH (basic helix-loop-helix) est notamment impliqué dans la régulation des gènes associés à la stratégie I d'acquisition du fer (Naranjo-Arcos et al., 2017). L'induction des gènes d'acquisition du fer requiert en particulier le facteur de transcription bHLH29, aussi connu sous l'appellation FIT (FER like iron deficiency induced transcription factor) qui a une fonction de régulation globale en formant des dimères avec d'autres bHLH tels que bHLH38 ou ORG2 et bHLH39 ou ORG3. Typiquement, l'expression de *FIT* et *ORG3* est induite lors d'une carence en fer (Kobayashi and Nishizawa, 2012). De manière remarquable, FIT intervient également dans la régulation de deux autres facteurs de transcription, MYB10 et MYB72, impliqués notamment dans l'induction de *NAS4* intervenant dans la synthèse de NA (Palmer et al., 2013). Ces interactions complexes et croisées sont associées à une véritable cascade de régulations du statut en fer dans la plante. Chez les plantes utilisant la stratégie II d'acquisition du fer

comme le riz, le gène *FIT* ne semble pas être présent (Grillet and Schmidt, 2019). En revanche d'autres régulateurs interviennent, OsIRO2 orthologue des AtBHLH 38, 39, 100 et 101 (Grillet and Schmidt, 2019).

Des études ont montré qu'il existait un lien étroit entre l'homéostasie du fer chez les plantes et la réponse aux stress biotiques. Par exemple, quand une infection se déclare, une compétition pour l'acquisition des nutriments, dont le fer, se met en place entre la plante hôte et le pathogène (Aznar and Dellagi, 2015). Il a été montré qu'une infection pouvait être associée à l'induction de gènes impliqués dans l'homéostasie du fer, notamment *NRAMP3*, *FRO2* et *IRT1* suggérant qu'une infection déclenche un signal similaire à celui d'une carence en fer (Segond et al., 2009).

Homéostasie du fer et peptides dont le rôle reste à explorer

Deux études récentes ont montré que l'expression du gène *IMA3* (IRON MAN 3) également nommé *FEP1* (FE-UPTAKE-INDUCING PEPTIDE 1) était fortement induite chez *A. thaliana* en condition de carence en fer (Grillet et al., 2018; Hirayama et al., 2018). Hirayama et al. (2018) ont montré en particulier qu'une délétion ou des mutations d'*IMA3/FEP1* étaient associées à une diminution de la quantité de fer dans les parties aériennes mais pas dans les racines. Il a aussi été montré que l'induction artificielle d'*IMA3/FEP1* était suffisante pour induire le système FIT et les gènes sous son contrôle (comme *ORG3*, *FRO2* et *IRT1*) et conduire à une accumulation de fer dans la plante (Grillet et al., 2018; Hirayama et al., 2018). Selon ces auteurs, IMA3 serait un peptide signal indiquant une carence en fer dans les parties aériennes de la plante. De plus IMA3 serait capable de lier le fer (Fe^{2+}) ainsi que d'autres métaux (Mn^{2+} , Cu^{2+} et Zn^{2+}) avec une affinité modérée (Grillet et al., 2018). Les deux groupes d'auteurs ont montré qu'*IMA3/FEP1* appartenait à une famille de peptides, IMA ou FEP, très conservée chez toutes les plantes (de stratégie I comme de stratégie II) et identifiable par la présence de deux motifs particuliers. Les auteurs ont identifié 8 peptides IMA/FEP dans le génome d'*Arabidopsis*. Néanmoins, si cette famille de peptides apparaît avoir un effet signal très important en amont des systèmes de régulation décrits jusqu'ici chez les plantes de stratégies I et II d'acquisition du fer, leur rôle reste à explorer (Grillet et al., 2019). Il est intéressant de noter que nous avons identifié *IMA3/FEP1* (alors non décrit et non nommé ; désigné par le terme "unknown protein") comme gène marqueur potentiel de l'effet de sidérophores bactériens sur la plante dans une étude de génomique translationnelle réalisée au début du

projet de thèse. Il s'agissait de rechercher chez le pois des orthologues de gènes répondant fortement à la pyoverdine chez *A. thaliana* identifiés à partir d'une étude de transcriptomique réalisée antérieurement (Trapet, 2015). L'étude correspondante et les résultats concernant l'expression de ce gène chez le pois sont présentés chapitre 5.

4. Interactions plante-microorganismes en relation avec la dynamique du fer

La santé des plantes peut être défavorablement ou favorablement impactée par les microorganismes dans des interactions biotiques impliquant le fer.

Les microorganismes sont susceptibles de rentrer en compétition avec les plantes pour l'acquisition du fer. La croissance des deux organismes peut être limitée ou une interaction parasite peut s'installer. C'est notamment le cas pour des phytopathogènes qui produisent des sidérophores pour acquérir du fer lors de l'infection de leur hôte (Expert et al., 1996; Ichinose et al., 2013). Par exemple, la production de pyoverdine par le phytopathogène *Pseudomonas syringae* est un facteur de pathogénicité important pour la colonisation de la plante infectée. Elle est aussi liée à la production d'autres facteurs de pathogénicité comme des toxines (Cornelis, 2010; Ichinose et al., 2013).

La santé des plantes peut aussi être protégée par des interactions biotiques impliquant le fer. La compétition pour le fer est à l'origine d'antagonisme entre microorganismes. La santé de la plante peut être protégée lorsque cet antagonisme limite la croissance saprophyte de microorganismes phytopathogènes (Höfte et Bakker, 2007). Il a par exemple été montré que la compétition pour le fer exercée par les *Pseudomonas* à l'encontre des *Fusarium* pathogènes via la production de pyoverdine était un élément déterminant de la résistance naturelle des sols de Salinas Valley (CA, USA) et de Châteaurenard (France) à la fusariose vasculaire (Kloepper et al., 1980; Scher and Baker, 1982; Lemanceau and Alabouvette, 1991; Lemanceau et al., 1992, 1993). Il a par ailleurs été rapporté que certains sidérophores bactériens avaient la capacité d'induire des réactions de défense de la plante de type ISR (Induced systemic resistance) protégeant ainsi la plante contre certaines maladies (Leeman et al., 1996; Maurhofer et al., 1998; Ran et al., 2005; Bakker et al., 2007; van Loon et al., 2008; Pieterse et al., 2014).

La production de sidérophores par les microorganismes mais aussi d'autres activités microbiennes sont associées à des modifications de la nutrition en fer des plantes et de nombreux mécanismes sont impliqués. Ce sujet est particulièrement important dans le cadre de la thèse. C'est pourquoi nous avons choisi de le présenter dans le chapitre 1 sous la forme d'une revue bibliographique où l'effet des microorganismes sur la nutrition en fer des plantes est replacé dans le contexte de la biofortification en fer. Cette revue est destinée à être publiée.

Si les activités microbiennes ont un impact déterminant sur la croissance et la santé des plantes, les plantes ont aussi une influence déterminante sur la composition de leur microbiote et donc, sur les activités microbiennes associées (Lemanceau et al., 2017a; Jones et al., 2019). Certaines études ont plus particulièrement mis en évidence l'influence du statut en fer de la plante sur son microbiote rhizosphérique.

Dans des travaux rapportés par Robin et al. (2006; 2007), deux tabacs prélevant des quantités de fer différentes dans la rhizosphère ont été étudiés : un tabac sauvage (WT) et un tabac transgénique (P6) dont les besoins en fer ont été augmentés par surexpression de la synthèse des ferritines. Il a été montré que la suraccumulation de fer par P6 s'accompagnait d'une réduction de la biodisponibilité de cet élément dans la rhizosphère. Ce changement d'environnement rhizosphérique a engendré des changements dans les communautés de *Pseudomonas* isolées du rhizoplan et des tissus racinaires. Les *Pseudomonas* associés au tabac transgénique étaient collectivement plus aptes à croître dans un environnement pauvre en fer. Certains des *Pseudomonas* associés à la plante transgénique produisaient un type particulier de pyoverdine ayant un potentiel antagoniste à l'encontre d'un oomycète phytopathogène lié à la compétition pour le fer et supérieur à celui des pyoverdines des bactéries associées à la plante sauvage. Il a aussi été montré, pour le trèfle incarnat, qu'en conditions de carence en fer la synthèse racinaire de composés phénoliques était accrue et qu'en conséquence le nombre de microorganismes producteurs de sidérophores ainsi que la synthèse des sidérophores étaient favorisés et facilitaient l'utilisation du fer de l'apoplaste (Jin et al., 2006, 2007; 2010).

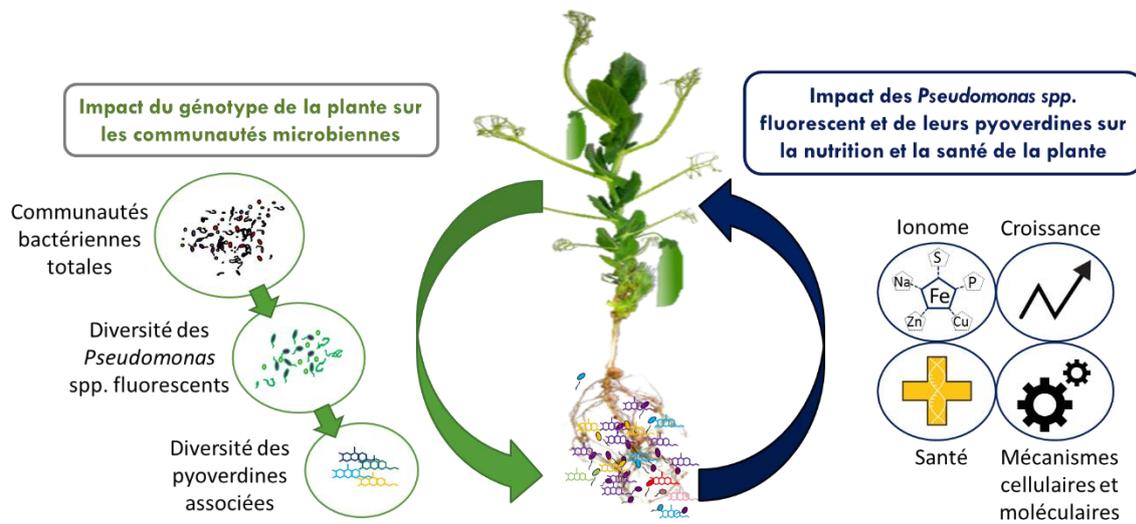


Figure 6. Représentation schématique de la stratégie de recherche développée pour l'étude des interactions entre pois et *Pseudomonas*.

5. Projet de thèse

De nombreux travaux mettent en évidence l'influence des microorganismes sur le statut en fer des plantes (**Chapitre I**). D'autres, suggèrent que des modifications de la structure des communautés microbiennes de la rhizosphère peuvent être induites par des variations du statut en fer de la plante, et pourraient en retour favoriser l'acquisition du fer et la santé de la plante. En particulier, le statut en fer d'une plante peut influencer le type de pyoverdine produit par les *Pseudomonas* associés à sa rhizosphère (Robin et al., 2007). Or, les pyoverdines présentent une très grande diversité de structure (Budzikiewicz, 2004; Cézard et al., 2015). Il a été montré que cette diversité structurale pouvait influencer l'activité des molécules. Leur affinité pour le fer, leur activité antagoniste à l'encontre d'un phytopathogène, et leur capacité à induire les défenses de la plante selon un mécanisme de type ISR peut varier (Budzikiewicz, 2004; Robin et al., 2007; van Loon et al., 2008). Par ailleurs, certaines pyoverdines modèles peuvent influencer la nutrition en fer de la plante (Jin et al., 2010; Shirley et al., 2001; Trapet et al., 2016; Vansuyt et al., 2007). Toutefois, à notre connaissance, on ignore si des pyoverdines différentes peuvent influencer différemment le statut en fer des plantes.

Dans un contexte où l'on cherche à améliorer la nutrition en fer du pois (*P. sativum*) pour favoriser sa culture, notre objectif a été d'évaluer l'importance des microorganismes, et plus particulièrement celle des *Pseudomonas* spp. fluorescents et des pyoverdines qu'ils synthétisent, dans la nutrition en fer et l'immunité du pois. Plus spécifiquement, on s'est interrogé sur le rôle des bactéries et de leurs sidérophores dans la sensibilité à la chlorose ferrique des cultivars de pois.

Le projet de thèse vise à caractériser les interactions pois – *Pseudomonas* spp. fluorescents en relation avec la nutrition en fer et la santé de la plante-hôte via les sidérophores bactériens. Il s'agit (i) d'évaluer l'influence du génotype (cultivar) de pois sur la diversité des sidérophores et en retour les effets biologiques de ces sidérophores sur la plante, et (ii) de progresser dans la connaissance des mécanismes impliqués, afin à terme d'identifier des cultivars de pois valorisant le mieux ces interactions. La stratégie choisie s'est donc appuyée sur le schéma conceptuel de la boucle de rétroaction particulièrement approprié dans le cadre de l'étude d'interactions entre organismes (**Figure 6**). Elle a également consisté à étudier deux cultivars de pois, l'un sensible (S), et l'autre tolérant (T), à la chlorose ferrique

afin de pouvoir dégager des hypothèses de la comparaison des données acquises avec ces deux génotypes. Une pyoverdine modèle (pvdC7R12), utilisée dans plusieurs études antérieures, et une plante modèle (*A. thaliana*), ont également été intégrées à ce travail pour progresser dans la connaissance des mécanismes impliqués dans les interactions étudiées.

Les travaux réalisés au cours de cette thèse sont présentés sous forme d'articles soumis ou destinés à être soumis. Des informations complémentaires ont été ajoutées à certains des manuscrits.

Le **chapitre I** est une synthèse bibliographique rapportant les différentes approches utilisées pour améliorer la teneur en fer des plantes (biofortification) et mettant en avant le rôle des microorganismes et des interactions plantes-microorganismes dans ces processus.

Le **chapitre II** présente le développement d'outils moléculaires pour l'étude de la diversité des *Pseudomonas* spp. fluorescents et des pyoverdines. Ces outils ont été utilisés pour comparer l'impact d'un pois sensible et d'un pois tolérant à la chlorose ferrique sur les communautés bactériennes de la rhizosphère, les *Pseudomonas* et les pyoverdines correspondantes. Les effets sur *A. euteiches* de *Pseudomonas* et de pyoverdines représentatifs de la diversité décrite ont été étudiés.

Le **chapitre III** présente l'étude de l'impact de pyoverdines sur la nutrition en fer et en autres éléments (ionome) de la plante (étude au niveau de l'organisme). Un objectif a été de comparer les effets de pyoverdines produites majoritairement par les *Pseudomonas* associés à la rhizosphère de chacun des deux pois étudiés sur ces plantes. Les effets de la pyoverdine modèle (pvdC7R12) ont également été étudiés.

Le **chapitre IV** présente l'étude de l'effet d'un apport en fer sous forme ferripyoverdine sur la plante au niveau cellulaire à l'aide d'un système modèle Fe-pvd/*A. thaliana*. Le travail a été réalisé en associant différentes méthodes de microscopie et de spectroscopie d'absorption des rayons X afin d'avancer dans la connaissance des mécanismes impliqués dans l'acquisition de fer sous forme ferripyoverdine par la plante.

Le **chapitre V** est consacré à l'étude de l'impact des pyoverdines produites majoritairement par les *Pseudomonas* associés à la rhizosphère de chacun des deux pois étudiés et d'une pyoverdine modèle sur la plante au niveau moléculaire. L'effet de

pyoverdines sur l'expression de gènes impliqués dans la nutrition en fer et la santé de la plante, a été étudié en relation avec les effets produits sur le statut en fer des plantes.

L'ensemble des résultats obtenus est discuté dans une dernière partie conclusive.

Chapitre I : Importance des interactions entre la plante et son microbiote dans la biofortification en fer

Manuscrit en préparation pour être soumis à

« Agronomy for Sustainable Development »

Avant-propos

Le travail de bibliographie réalisé dans le cadre de ce projet de thèse et portant sur les effets des microorganismes sur le statut en fer des plantes a conduit à faire différentes constatations. D'une part, si de nombreuses études rapportent des effets de microorganismes sur les plantes et le fer, aucune revue récente ne permet d'avoir une vue d'ensemble sur ces travaux souvent très hétérogènes. D'autre part, les études traitant de l'effet des microorganismes sur le statut en fer des plantes et celles portant sur l'étude de la nutrition en fer des plantes et sur son amélioration sont généralement dissociées. En conséquence, les revues réalisées sur ces sujets le sont aussi pour la plupart. Les microorganismes sont parfois évoqués dans certaines revues centrées sur les plantes, mais dans ce cas, ils sont essentiellement présentés comme des biofertilisants. C'est le cas par exemple dans l'intéressante revue de Zuo et Zhang (2011) sur les stratégies de gestion du sol et des cultures pour prévenir la déficience en fer des cultures. Jin et al. ont publié en 2014 une revue qui fait le point sur la contribution des microorganismes dans l'acquisition du fer par la plante. Ce travail, centré sur les microorganismes, mais prenant aussi en compte certaines connaissances acquises sur les plantes nous a paru particulièrement intéressant. Selon le même principe nous avons cherché à faire une synthèse bibliographique élargie à d'autres effets que ceux portant sur l'acquisition du fer et qui prenne en compte l'avancée des connaissances. Dans cette synthèse, les effets des interactions entre la plante et son microbiote sur le statut en fer de cette dernière ont été présentés dans le cadre des principales stratégies utilisées pour la biofortification en fer des plantes : (i) augmenter la biodisponibilité du fer pour les plantes, (ii) utiliser les ressources génétiques des plantes et (iii) associer des cultures. Ce choix a été fait pour mettre en évidence de nouvelles voies potentielles d'amélioration basées sur la valorisation des interactions biotiques.

Cette synthèse bibliographique a été rédigée comme une revue destinée à être soumise à « *Agronomy for Sustainable Development* ».

Importance of plant-microbiota interactions in plant iron nutrition, new opportunities for plant iron biofortification.

Tristan Lurthy¹, Barbara Pivato¹, Philippe Lemanceau¹, Sylvie Mazurier¹

¹ Agroécologie, AgroSup Dijon, INRAE, Univ. Bourgogne, Univ. Bourgogne Franche-Comté, F-21000 Dijon, France

Total number of tables: 1

Total number of figures: 2

Total number of references: 228

Number of pages: 44

Key words: iron; plant nutrition; biofortification; plant-microorganism interactions; siderophores;

Correspondence: S. Mazurier, UMR 1347 Agroécologie, 17 rue Sully, BV 86510, F-21065 Dijon cedex, France

E-mail: sylvie.mazurier@inra.fr

1. Introduction

The world population is growing rapidly and global food production has to increase accordingly. 'Low hunger' together with 'Good health and well-being' are two of the main 'Sustainable Development Goals' presented in the United Nations Development Program (UNDP 2015). Nowadays world food stock cannot fully feed the world population and a lot of developing countries cannot access to a varied diet leading to micronutrient deficiencies (MNDs), a lack of essential minerals and vitamins. The main MNDs concern iron (Fe), Zinc (Zn) and vitamin A. This worldwide problem is mainly associated with poverty and food insecurity affecting over three billion people (Chasapis et al. 2012).

Iron deficiency is the main case of MND in the world, in poor, but also in developed countries. Iron deficiency can lead to dangerous consequences for health, as microcytic anemia, impaired immune function and poor endocrine function (Bailey et al. 2015; Wakeel et al. 2018; World Health Organization 2018). Indeed, iron is known to play an essential role in the physiology of living organisms in which it has a hand in DNA synthesis, respiration and photosynthesis (Aisen et al. 2001).

With about 20 to 60% of Fe in the form of haemproteins, easily assimilable by the human body, meat is the main source of iron in food (Cross et al. 2012). However, meat is not accessible to everybody. In developing countries and for vegetal-based diets, iron is supplied by plant products such as cereal grains that contain low levels of Fe and high levels of anti-nutritional compounds such as phytates (Gómez-Galera et al. 2010). Moreover, the development of intensive agriculture in the 1950's and the introduction of semi-dwarf, high-yielding cultivars has induced a decreased of grain iron concentration (Fan et al. 2008). At the same time, concern is raising about the environmental cost (e.g. Carbon, water) of animal production. Thus, improving human iron nutrition represents a major challenge and cropping systems aiming at increasing the amount of iron and its assimilability in staple food compatible with sustainable agriculture are required.

An approach used to increase iron amount in vegetal food is Micronutrient Fortification, which consists of artificially supplementing food with micronutrients (iron, copper, vitamins...). The Food Fortification Initiative (<http://www.ffinetwork.org/>) created a network of governmental and private sectors in several developing countries to promote the

fortification of wheat flour. It has increased the use of Fe-fortified wheat flour in these countries from 18% in 2004 to 27% in 2007, helping 540 million people to prevent Fe deficiency (White and Broadley 2009). More recently, promising results were obtained in India, Philippines and Rwanda populations with rice, pearl millet and beans supplemented in iron (Finkelstein et al. 2017, 2019).

Iron biofortification of plants appears to be more sustainable and cheaper than Micronutrient Fortification (Murgia et al. 2012; World Health Organization 2017). The objective is to promote plant iron nutrition to increase iron content in plant edible parts such in leaf (e.g. lettuce or spinach) and root vegetables (e.g. carrot or cassava), in fruits (e.g. peach, apple...), and in grains, representing the major staple foods across the world. Iron biofortification implies to monitor plant iron uptake and homeostasis.

A major barrier to iron biofortification is the poor bioavailability of iron in most soils. Although iron is the fourth element in quantity on Earth after oxygen, silica and aluminum, at pH compatible with growth of most plant crops, Fe is not readily available for living organisms including plants (Lemanceau et al. 2009). Iron availability depends on soil properties and more specifically on soil pH and redox potential (Robin et al. 2008; Colombo et al. 2014). Immobilization of iron in the form of scarcely soluble complexes formed between Fe^{3+} and hydroxides, oxyhydroxides, and oxides, increases with soil pH (Robin et al. 2008). The low iron availability is particularly acute in alkaline soils which represent about 30% of world's croplands and up to 40% of arable surfaces (Chen and Barak 1982; Sullivan and Gadd 2019). In these soils, plant growth might be limited by the low availability of iron and even develop Iron Deficiency Chlorosis (IDC), interveinal chlorosis due to iron deficiency, which negatively impacts crop yield (Briat et al. 2015) and quality (i.e. iron content).

It has long been demonstrated that soil microorganisms can promote plant iron nutrition. Different studies have reported the beneficial impact of soil microbiota on plant iron status by comparing plant iron content after growth in sterile or non-sterile soil. Sunflower and maize grown in a sterile unfertilized soil contained less iron than in the non-sterile soil; sunflower even developed chlorosis due to the drop of iron level (Masalha et al. 2000). Similar observations were made for rape and red clover (Rroço et al. 2003; Jin et al. 2006). A high occurrence of cultivable oligotrophic bacteria in lupine rhizosphere was correlated to an increased concentration of Fe together with Cu, Mn and Zn in plant shoots suggesting that this

fraction of the rhizosphere microbiota would be associated to the promotion of plant iron and mineral nutrition (de Santiago et al. 2019). Numerous studies have further reported the effects of specific strains or metabolites of microorganisms, taxonomically diverse and encompassing root symbionts, on iron status of a variety of plant species (**Table 1**). Despite the acknowledged contribution of biotic interactions on plant iron nutrition, these interactions are rarely valued for plant biofortification.

Increasing knowledge on plant iron uptake and homeostasis, and on biotic, especially plant-microorganisms, interactions evidence many possible contributions of plant microbiota to plant iron nutrition and suggests that importance of the corresponding microorganisms may have been underestimated in the strategies for iron biofortification of plants. We present here an overview of the state of art that shed light on the dynamic interplay between plants and their microbiota promoting iron biofortification and on possible strategies contributing to that promotion through the following sections: (i) increasing iron bioavailability to plants, (ii) valuing plant genetic resources, and (iii) designing beneficial cropping systems. In fine, we discuss promising new avenues for iron biofortification taking into account the dynamic interplay between the plant and its microbiota.

Table 1 Microorganisms and microbial metabolites influencing plant iron status

Microorganisms and/or microbial metabolites	Application mode	Plant	Effect on plant iron status	Additional observations	Effect on plant genes	References
<i>Burkholderia cepacia</i> JFW16	Bacterial suspension	<i>Astragalus sinicus</i>	Plant [Fe]/Fe [^] , chlorophyll [^]	Rhizosphere acidification, root FR [^] , flavin release, Sid and phytohormone production	<i>FRO2</i> expr. [^] , <i>IRT1</i> expr. [^] , <i>AHA2</i> expr. [^] , <i>FIT1</i> expr. [^]	(Zhou et al. 2018)
<i>Burkholderia terricola</i> LMG20594 ; <i>Pseudomonas brassicacearum</i> NFM421; <i>B. pyrrocinia</i> LMG14191; <i>P. mandelii</i> NBRC103147; <i>Herbaspirillum huttiense</i> NBRC10252	Bacterial suspension	Lentil, pea	Plant [Fe]/Fe [^]	Rhizosphere acidification, Sid production [^] , phytohormone production [^]		(Reza et al. 2017)
<i>Pseudomonas fluorescens</i> ATCC13525	Bacterial suspension	Tomato	Plant [Fe]/Fe [^]		<i>IRT1</i> expr. [^] , <i>FRO2</i> expr. [^] , <i>NRAMP3</i> expr. [^]	(Nagata 2017)
<i>Paenibacillus polymyxa</i> BFKC01	Bacterial suspension	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Plant [Fe]/Fe [^] , chlorophyll [^]	Root FR [^] , phytohormone production [^]	<i>FRO2</i> expr. [^] , <i>IRT1</i> expr. [^] , <i>FIT1</i> expr. [^] , <i>MYB72</i> expr. [^]	(Zhou et al. 2016)
<i>Pseudomonas</i> spp.; <i>Enterobacter</i> spp.; <i>Bacillus sporothernodurans</i>	Bacterial suspension	Sunflower	Plant [Fe]/Fe [^] , chlorophyll [^]	Sid production [^] , phytohormone production [^] , phosphate solubilization [^] , HCN production [^]		(Pourbabae et al. 2018)

Microorganisms and/or microbial metabolites	Application mode	Plant	Effect on plant iron status	Additional observations	Effect on plant genes	References
<i>Rhizobium leguminosarum</i> bv. <i>phaseoli</i> ; <i>Pseudomonas</i> spp. Avm	Bacterial suspension	Common bean	Plant [Fe]/Fe [^] , modif. Fe distrib.	WT variety more efficient in Fe uptake than cultivated variety after microbial inoculation		(Carrillo-Castañeda et al. 2005)
<i>Bacillus subtilis</i> BHHU10, <i>Trichoderma harzianum</i> TNHU27, and <i>Pseudomonas aeruginosa</i> PJHU15 (consortium)	Bacterial and fungal coating	Pea	Modif. Fe assimil.	Phenolic, favonoid, ascorbic acid and protein content [^]		(Jain et al. 2014)
<i>Arthrobacter sulfonivorans</i> DS-68; <i>Enterococcus hirae</i> DS-163	Bacterial coating	Wheat	Plant [Fe]/Fe [^] , seeds [Fe]/Fe [^] , modif. Fe assimil.	Anti-nutritional factor ^v		(Singh et al. 2018)
<i>Pseudomonas fluorescens</i> C7R12; pyoverdine from <i>P. fluorescens</i> C7R12	Bacterial suspension; apo-siderophore	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Root [Fe]/Fe ^v , shoot [Fe]/Fe [^]	Changes in plant hormone production, Incorporation of Fe-pyoverdine suggested by ¹⁵ N-labelling and immunodetection	Numerous modifications evidenced in a transcriptomic study	(Trapet et al. 2016)
<i>Bacillus subtilis</i> GBO3	Bacterial suspension; Bacterial VOC	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Plant [Fe]/Fe [^] , chlorophyll [^]	Rhizosphere acidification, root FR [^]	<i>FRO2</i> expr. [^] , <i>IRT1</i> expr. [^] , <i>FIT1</i> expr. [^]	(Zhang et al. 2009)
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> BF06	Bacterial VOC	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Plant [Fe]/Fe [^]	Root FR [^] , Fe ²⁺ production [^] , Production of VOC implied (2R or 3R-butanediol)	<i>FRO2</i> expr. [^] , <i>IRT1</i> expr. [^] , <i>FIT1</i> expr. [^]	(Wang et al. 2017)

Microorganisms and/or microbial metabolites	Application mode	Plant	Effect on plant iron status	Additional observations	Effect on plant genes	References
Azotochelin, Sid of <i>Azotobacter vinelandii</i> obtained commercially	Fe-siderophore	Soybean	Plant [Fe]/Fe [^]			(Ferreira et al. 2019)
Pseudobactin, syn. pyoverdine Sid from <i>Pseudomonas aureofaciens</i> (ATCC15926)	Fe-siderophore	Pea, maize	Shoots [Fe]/Fe ^v chlorophyll ^v			(Becker et al. 1985b)
Aerobactin, Sid of <i>Citrobacter diversus</i>	Fe-siderophore	Soybean	Plant [Fe]/Fe [^]	Fe ²⁺ production ^v		(Chen et al. 2000)
Agrobactin, Sid from <i>Agrobacterium tumefaciens</i> (B6)	Fe-siderophore	Pea, bean	Shoots [Fe]/Fe [^] chlorophyll [^]			(Becker et al. 1985a)
Pyoverdine, Sid from <i>Pseudomonas fluorescens</i> (C7R12)	Fe-siderophore	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Plant [Fe]/Fe [^]	An IRT1 mutant still incorporated Fe-pyoverdin, incorporation of Fe-pvd suggested by ¹⁵ N-labelling and immunodetection		(Vansuyt et al. 2007)
Ferrichrome A, Sid from <i>Ustilago sphaerogena</i> (ATCC 12421); ferrioxiamine B Sid from <i>U. sphaerogena</i> (ATCC 12421)	Fe-siderophore	Oat	Plant [Fe]/Fe [^]			(Crowley et al. 1988)

Microorganisms and/or microbial metabolites	Application mode	Plant	Effect on plant iron status	Additional observations	Effect on plant genes	References
Ferrioxamine B, Sid of <i>Streptomyces</i> spp. obtained commercialy	Fe-siderophore	Cucumber	Plant [Fe]/Fe [^] , chlorophyll [^]	Siderophore in the xylem		(Wang et al. 1993)
Ferrioxamine B, Sid of <i>Streptomyces</i> spp. obtained commercialy	Fe-siderophore	Onion	Plant [Fe]/Fe ^v	Root FR unchanged		(Manthey et al. 1996)
Ferrioxamine B, Sid of <i>Streptomyces</i> spp. obtained commercialy	Fe-siderophore	Pine	Plant [Fe]/Fe ^v in mycorrhizal plant			(Leyval and Reid, 1991)
Ferrioxamine B, Sid of <i>Streptomyces</i> spp. obtained commercialy	Fe-siderophore	Cotton, maize	Root [Fe]/Fe [^] , chlorophyll [^]	Fe removal from chelate around the root		(Bar-Ness et al. 1992)
Pyoverdine, Sid from <i>Pseudomonas fluorescens</i> (C7R12)	Fe-siderophore	<i>Arabidopsis thaliana</i> , tobacco, barley, wheat, fescue, rye grass	Plant [Fe]/Fe [^]	Incorporation of Fe-pyoverdine suggested by ¹⁵ N-labelling		(Shirley et al. 2011)
Rhizoferrin, Sid of <i>Rhizopus arrhizus</i>	Fe-siderophore	Tomato	Modif. Fe distrib. root [Fe]/Fe [^] , chlorophyll [^]	root FR [^]		(Yehuda et al. 2000)
Rhizoferrin, Sid of <i>Rhizopus arrhizus</i>	Fe-siderophore	Tomato	Modif. Fe distrib., root [Fe]/Fe [^]			(Shenker et al. 1995)

Microorganisms and/or microbial metabolites	Application mode	Plant	Effect on plant iron status	Additional observations	Effect on plant genes	References
Hydroxamate, Sid mixture from <i>Penicillium chrysogenum</i>	Fe-siderophore	Cucumber, maize	Plant [Fe]/Fe [^]	Fe ²⁺ production [^]		(Hördt et al. 2000)
<i>Pseudomonas</i> spp. Sid	Fe-siderophore	Red clover	Plant [Fe]/Fe [^] , chlorophyll [^]	Iron solubilization [^]		(Jin et al. 2010)
Pyoverdine, Sid from <i>Pseudomonas fluorescens</i> ATCC13525	Fe-siderophore	Tomato	Plant [Fe]/Fe [^] , chlorophyll [^]		<i>FRO1</i> expr. ^v , <i>IRT1</i> expr. ^v	(Nagata et al. 2013)
Pseudobactin, syn. pyoverdine Sid from <i>Pseudomonas putida</i> WCS358	Fe-siderophore	Barley	Modif. Fe distrib., root [Fe]/Fe [^] , chlorophyll [^]	No Fe exchange between pyoverdine and phytosiderophore		(Duijff et al. 1994)
<i>Trichoderma asperellum</i> T34	Fungal conidia	White lupin	Shoot [Fe]/Fe [^]	peroxidase activity [^] , catalase activity [^]		(de Santiago et al, 2009)
<i>Trichoderma asperellum</i> T34	Fungal conidia	Cucumber	Shoot [Fe]/Fe [^]	Fe-siderophores used as a source of iron under iron deficiency		(de Santiago et al, 2013)
<i>Glomus intraradices</i> syn. <i>Rhizophagus intraradices</i> DAOM197198	Fungal spores	Maize	Shoot [Fe]/Fe [^]	Genes implied in strategy II were not induced	<i>OPT8</i> expr. [^] , <i>NAS</i> expr. [^]	(Kobae et al. 2014)
<i>Glomus irregulare</i> syn. <i>Rhizophagus irregularis</i> DAOM197198	Fungal spores	Chicory	Root [Fe]/Fe [^]	Root exploration volume [^] , production of phosphatase [^]		(Labidi et al. 2012)

Microorganisms and/or microbial metabolites	Application mode	Plant	Effect on plant iron status	Additional observations	Effect on plant genes	References
<i>Paenibacillus cookie</i> JGR8; <i>Pseudomonas pseudoalcaligenes</i> JGR2; <i>Bacillus megaterium</i> JGR9	Liquid bacterial culture	<i>Typha angustifolia</i>	Shoots [Fe]/Fe [^]	Sid production [^] , phytohormone production [^] , phosphate solubilization [^]		(Ghosh et al. 2014)
<i>Bacillus subtilis</i> GBO3	Liquid bacterial culture	Cassava	Shoots [Fe]/Fe [^]			(Freitas et al. 2015)
<i>Chryseobacterium</i> spp.C138	Liquid bacterial culture	Tomato	Plant [Fe]/Fe [^]			(Radzki et al. 2013)
<i>Pseudomonas putida</i> MTCC 103, Enterobacteria	Liquid bacterial culture	Rice	Plant [Fe]/Fe [^] , seeds [Fe]/Fe [^]	Variation of peroxidase activity, iron solubilization [^]		(Sharma et al. 2013)
<i>Rhizobium leguminosarum</i> PR1; <i>Pseudomonas</i> sp. PGERs17	Liquid bacterial culture	Lentil	Plant [Fe]/Fe [^] , chlorophyll [^]	Nodulation [^] , leghaemoglobin [^] ,		(Mishra et al. 2011)
<i>Arthrobacter sulfonivorans</i> DS-68; <i>Arthrobacter</i> sp. DS-179	Liquid bacterial culture coating	Wheat	Plant [Fe]/Fe [^]	Organic acid production [^]	ZIP expr. [^]	(Singh et al. 2017)

Fe]/Fe, iron concentration and/or iron amount. [^], increase. FR, ferric reductase. Sid, siderophore. expr., expression. HCN, hydrogen cyanide. bv., biovar. Fe distrib. modif., Fe distribution modification. mod. assimil., modification assimilation. VOC, volatile organic compound. DPH, N,N'-diisopropylhexanediamide. syn, synonyme. ^v, decrease.

2. Increasing iron availability to plants

Plant iron uptake. Increasing efficiently iron availability to plants necessarily relies on the information related to iron forms available to plants and to plant and microbial mechanisms contributing to these forms and uptake. Current knowledge indicates that plants uptake iron in its oxidized forms via active systems of iron acquisition, the ferrous iron cation (Fe^{2+}), and ferric iron in the form of ferric-chelate (Fe^{3+} -chelate); distinct Fe^{3+} -chelates being concerned (**Figure 1**). Many studies have been dedicated to the two main strategies of root iron acquisition described so far: strategy I or reducing strategy, and strategy II or chelating strategy (Curie and Briat 2003; Curie et al. 2009; Kobayashi and Nishizawa 2012; Connorton et al. 2017). Strategy I is found in non-graminaceous monocots and dicots, and relies on: (i) reduction of Fe^{3+} by a Ferric Reduction Oxydase (encoded by a *FRO* gene; e.g. *FRO2* in *Arabidopsis*), and (ii) Fe^{2+} incorporation into the root by an Iron-Regulated Transporter (encoded by an *IRT* or a *RIT* gene; e.g. *IRT1* in *Arabidopsis*). Acidification of the rhizosphere following extrusion of protons by plasma membrane proton pumps (PM H^{+} -ATPases encoded by an *HA* gene; e.g. *AHA2* in *Arabidopsis*) increases the solubilization of Fe^{3+} . Strategy II, found in grasses, relies on excretion of phytosiderophores (PS, structural derivatives of mugineic acid) by a Transporter of Mugineic acid (encoded by a *TOM* gene; e.g. *TOM1* in rice) chelating Fe^{3+} (Fe^{3+} -PS) before incorporation into the root by an oligopeptide transporter belonging to the YS/YSL family (Yellow Stripe/Yellow Stripe Like; e.g. YSL15 in rice) (Curie et al. 2009). This differentiation between plant species according to their iron uptake strategy has its own limits as indicated by the implication of both strategies in rice, barley and peanut (Ishimaru et al. 2006; Pedas et al. 2008; Xiong et al. 2013). Also, production of coumarins, fluorescent phenolic compounds (FPC) with iron chelating activity, and synthesized via the phenylpropanoid pathway (e.g. *F6'H1* and *S8H* encoding final steps of coumarins synthesis leading to production of scopoletin and fraxetin in *Arabidopsis*, respectively) secreted via an ABC transporter (e.g. ABCG37/PDR9 in *Arabidopsis*) were shown to contribute to root iron acquisition in *Arabidopsis* (strategy I plant), especially in alkaline environments (Fourcroy et al. 2014; Schmid et al. 2014; Schmidt et al. 2014). According to Fourcroy et al. (2016), iron of the Fe^{3+} -PC chelate would be uptaken by the plant via the strategy I since the chlorotic phenotypes of *IRT1* and *FRO2* mutants were not restored by FPC from plant exudates. However, based on a review of results

obtained under phosphate (Pi) deficient conditions, Tsai and Schmidt (2017) hypothesized the existence of an auxiliary Iron Chelate Transporter (ICT), IRT1-independent. ICT would bypass the IRT1 uptake system and internalize the Fe-FPC complex under Pi-deficient conditions. In other plant species, flavins, belonging to another family of phenolic compounds than coumarins, have been reported to increase iron solubilization in the rhizosphere (Rodríguez-Celma et al. 2013; Sisó-Terraza et al. 2016). Iron solubilization by secretion of phenolics was also described in rice, a strategy II plant (Bashir et al. 2010; Ishimaru et al. 2011). Besides Fe³⁺-PS and Fe³⁺-FPC, organic ferric-chelates (Fe³⁺-OC) formed with organic acids (citrate, succinate...) are also used by plants (Abadía et al. 2011; Adeleke et al. 2017). Synthetic ferric chelates (Fe³⁺-SC) used in iron fertilization such as Fe-EDDHA or Fe-EDTA can supply the strategy I iron uptake system with iron, however entire chelates have been retrieved in roots and shoots (Orera et al. 2009, 2010). These small hydrophilic molecules are suspected to use the transpiration stream as driving force of entry although mechanisms involved remain largely unknown (Abadía et al. 2011). Iron uptake by leaves uses plant uptake systems described for roots (Malhotra et al. 2019).

Fig. 1 Effects of microorganisms on plant iron status and processes involved. (A), an overview of the effects of microorganisms on plant iron status described in the literature and presented in Table 1. (B), microbial activities influencing plant iron status presented on a schematic summary of active plant iron acquisition systems. Plant transporters and enzymes that play key roles in iron uptake in dicotyledons and non-graminaceous monocots are represented in blue, and in grasses are represented in red. In iron uptake strategy I (reductive strategy), protons are extruded by H⁺-ATPases (e.g. AHA in *Arabidopsis*), Fe³⁺ is reduced by plant ferric reductases (e.g. FRO2 in *Arabidopsis*) in ferrous iron (Fe²⁺) which is internalized in root cells by a specific transporter (e.g. IRT1 in *Arabidopsis* or IRT-like as described in rice and barley). Excretion of root fluorescent phenolic compounds (FPC) via ABC transporters (e.g. PDR9 in *Arabidopsis*) contributes to strategy I iron uptake and more specifically to re-mobilisation of root apoplastic iron which can be internalized via IRT1. In iron uptake strategy II (chelating strategy), Fe³⁺ is chelated by phytosiderophores (PS) and the complex Fe-PS is internalized by a specific transporter (e.g. TOM in rice or YSL-like as described in peanut). A non-reductive mechanism controlled by phosphorus (P) plant status, which would imply a putative specific iron chelate transporter (ICT) is suspected to be involved in the internalization of chelates formed by Fe³⁺ reduced and complexed by FPC (Fe²⁺-FPC). Microbial activities are indicated by circled numbers. ① Acidification by the production of protons (H⁺), organic acids (OA) and ② chelation by OA or microbial siderophores (MS) and hydrogen cyanide (HCN), solubilize ferric iron (Fe³⁺) immobilized in scarcely soluble or insoluble forms (O(OH)_n). Acidification and chelation increase bioavailability of Fe³⁺ to plants. ③ Complexes formed by Fe³⁺ and MS (Fe³⁺-MS) are suspected to be internalized by a non-reductive process (MST); recent results indicate that endocytosis might be implied (represented by vesicles). ④ Some rhizosphere microorganisms metabolize cellulose, hemicellulose and putrescine, or produce putrescine, thereby modifying key determinant molecules in root apoplastic iron storage and re-mobilisation. ⑤ Microorganisms triggering induced systemic plant resistance (ISR) influence the production of FPC which contribute to plant iron uptake and more specifically to re-mobilisation of root apoplastic iron through the modulation of expression MYB72 (root transcription factor) and BGLU42 (beta-glucosidase). ⑥ Microorganisms influence the expression of key genes in plant response to iron deficiency (*FIT*, FER-like Induced Transcription factor; *AHA*, *FRO2*, *IRT1*). ⑦ Microorganisms influence plant hormone status (directly by consumption or synthesis, or indirectly by induction of plant defence responses) which modulates plant iron status (JA, jasmonic acid; Et, ethylene; ABA, abscisic acid; NO, nitric oxide; GA, gibberellin; SA, salicytic acid; IAA, indole-3-acetic acid). ⑧ Microorganisms influence plant phosphorus (P) status which is implied in the regulation of plant iron status; the mechanisms implied in Fe³⁺ solubilization (*) also influence P plant bioavailability, both elements being sparingly soluble in soil. ⑨ Phytosiderophore piracy by soil bacteria influences strategy II plant iron uptake. Slash-dotted arrows indicates interrelations between various components of plant physiology influencing plant iron acquisition and redistribution.

Iron fertilization. Iron fertilization is a common agricultural practice generally used to mitigate plant iron deficiency but not in order to increase staple food quality. Iron supplementation of field, soil, and seed are performed in order to promote iron uptake by roots. Fe fertilizers are also applied on leaves for leaf uptake, or by trunk injection for introduction directly into the plant vascular system. Three main groups of Fe fertilizers are used, inorganic Fe compounds, synthetic Fe-chelates, and organic Fe-complexes (Abadía et al. 2011; Zanin et al. 2019). Inorganic Fe compounds such as iron sulfate or ferric hydroxides are the cheapest however, applied to soil, they are submitted to the same chemical equilibria that endogenous forms of iron and do not increase iron availability to plants. Their utilization only increases plant iron concentrations when applied to the leaves. Organic Fe-chelates can increase iron availability to plants but are more expensive than inorganic Fe compounds and are easily degraded since they present a relatively low affinity for iron. Synthetic Fe-chelates show a high affinity for iron still available for the plants and thus are the most efficient but also the most expensive iron fertilizers. In addition to their high costs, incorporation of the ligands into edible parts of the plant can be regarded as a problem since they could be retrieved in food. These limitations also apply even more to new nano-chelates under development (Yuan et al. 2018). To summarize, efficient Fe fertilizers have several drawbacks, these chemical inputs are expensive, their efficiency is variable, and they may be incorporated in the host-plant including in the edible parts. This explains why applications of Fe fertilizers are limited to mitigate IDC problems. Thus, they do not represent sustainable options for increasing iron content in agricultural products despite reports on iron foliar applications for increasing grain iron content of rice and barley grains (Slamet-Loedin et al. 2015).

In most agricultural soils, iron amounts are above plant needs although not readily available. Therefore, taking advantage of endogenous iron sources by increasing its availability represents an important challenge in sustainable agriculture. Cultural practices which impacts rhizosphere pH (e.g. nitrogen $\text{NO}_3^-/\text{NH}_4^+$ fertilization) or regulates pO_2 (e.g. irrigation in rice crops) contribute to the regulation of Fe bioavailability in the rhizosphere (Zuo and Zhang 2011). Besides these abiotic parameters, soil microbiota also has a decisive influence on environmental conditions and iron bioavailability in the rhizosphere.

Impact of microorganisms on iron availability to plants. Modifications of the rhizosphere environment due to microbial activities, such as acidification via the production of organic acid and the generation of protons, and iron chelation by organic acids and siderophores, increase iron solubilization and thus iron availability to plants.

Protons are released by nitrifying microorganisms during nitrogen NH_4^+ reduction process and contribute to rhizosphere acidification, along with that from plant roots (Hinsinger et al. 2003; Norton and Ouyang 2019). Protons come also from phosphate solubilizing microorganisms (Sharma et al. 2013). Iron initially bound in scarcely soluble minerals (e.g. hematites, goethites...) and amorphous solids (e.g. $\text{Fe}(\text{OH})_3$...) are replaced at sorption sites by the protons released and are therefore mobilized in the soil solution (Albrecht-Gary and Crumbliss 1998; Glasauer et al. 2003). Acidification also results from organic acids produced by rhizosphere bacteria, especially those solubilizing phosphates (e.g. *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Rhizobium* and *Enterobacter*) (Werra et al. 2009; Adeleke et al. 2017). In addition, at pH higher than the pKa of organic acids exuded by microorganisms, protons are released from carboxylic groups (Glasauer et al. 2003). Interestingly, Fe and P are often sequestered together in low solubility minerals such as strengtite or phosphosiderite in soils. They are therefore sparingly-soluble, and iron solubilization will enhance P availability (Marschner et al. 2011; Rijavec and Lapanje 2016).

Chelation also promote iron solubilization. Indeed, microbial metabolites with affinity for iron, such as organic acids and siderophores, scavenge ferric iron immobilized in scarcely or insoluble forms. Iron is therefore solubilized and mobilized in the soil solution, thus increasing its availability to plants (Kraemer 2004; Jin et al. 2010; Ferret et al. 2014). Siderophores are small molecules presenting iron chelating ability. Microbial siderophores are very diverse in size and chemical composition, and present high but variable affinity for Fe^{3+} (Budzikiewicz 2004; Saha et al. 2016; Khan et al. 2019). It has been long demonstrated that plants use microbial siderophores (MS) as a source of iron in limiting conditions (reviewed by Crowley 2006; Vansuyt et al. 2007; Jin et al. 2010; Shirley et al. 2011; Nagata et al. 2013; Radzki et al. 2013; Trapet et al. 2016). In particular, ferripyoverdines (Fe-pvds), ferric iron complexed with pyoverdines (pvds), siderophores produced by fluorescent pseudomonads, were shown to provide Fe to strategy I and strategy II plants more efficiently than the synthetic ferric chelate (Fe-EDTA) (Vansuyt et al. 2007; Jin et al. 2010; Shirley et al. 2011). Mechanisms

underlying the beneficial effect of microbial siderophores on plant nutrition remains to be elucidated even if some insights have been given (Vansuyt et al. 2007). Organic acids present much lower affinities for iron than siderophores, but in circumneutral and alkaline environments such as calcareous soils, organic acids may be deprotonated and thus act as metal-complexing agents (Dehner et al. 2010). Hydrogen cyanide (HCN), mediating beneficial effects of bacterial strains on plant growth and health, also contributes to iron mobilization via chelation (Frey et al. 2010; Rijavec and Lapanje 2016).

Theoretically, microorganisms appear to be highly competitive for Fe compared to plant roots because they can (i) use Fe bound to PS (compared to PS, MS such as pyoverdine have much higher affinity towards Fe), (ii) decompose PS and (iii) acquire iron more efficiently (Marschner et al. 2011; Boiteau et al., in press). Negative effects of MS on plant iron nutrition indicating that competition for iron may be detrimental to plants under certain conditions have been reported (e.g. Becker et al. 1985 in **Table 1**). However, a great majority of studies reports beneficial effects of microorganisms on plant iron nutrition (**Table 1**). This indicates that, in many cases, negative impact of MS on iron bioavailability may be outweighed by some other positive effects.

3. Utilization of genetic resources to master plant iron status

Progresses in the knowledge of the molecular mechanisms mediating plant iron uptake (previously summarized in part 2) and iron homeostasis in planta open opportunities in plant breeding to improve iron nutrition and iron content in agricultural products (Waters and Sankaran 2011).

Plant iron homeostasis. Due to its redox properties, iron is a central cofactor for enzymatic reactions with electron transfer, in essential metabolic pathways such as respiration or photosynthesis (Balk and Schaedler 2014). However, being a redox-active element, iron is also potentially toxic. Free Fe²⁺ catalyses the Fenton reaction and generates reactive oxygen species (ROS) characteristic of oxidative stress that may cause irreparable damage to cellular components when present in excessive concentrations (Winterbourn 1995). The intracellular concentrations and forms of iron are therefore tightly regulated at the cellular level. Mechanisms involved in iron homeostasis in strategy I and II plants have many

features in common (Connorton et al. 2017; Kobayashi et al. 2019; Grillet and Schmidt 2019). In planta, chelation allows iron mobilization and the control of its high reactivity. Nicotianamine is the main chelator of ferrous iron, Fe²⁺-NA, and represents a form of iron essential in the symplastic transport across root cells until it reaches the vascular tissues (Curie et al. 2009). Fe²⁺-NA is also involved in iron long distance transport, principally in the phloem (Kobayashi et al. 2019). Nicotianamine results from the dimerization of S-adenosylmethionine catalysed by nicotianamine synthases (encoded by a *NAS* gene; e.g. *NAS4* in *Arabidopsis* or *NAS1/2* in rice). In the xylem and in the apoplasm, iron is mostly present in the form of Fe³⁺-citrate (Rellán-Álvarez et al. 2010). In strategy II plants, ferric iron is also present in the form Fe³⁺-PS (Zhang et al. 2019).

Iron is also stored in unreactive forms such as ferritins which is a major storage form mainly found in chloroplasts and mitochondria. These globular proteins form a nanocage in which thousands of Fe³⁺ ions are encapsulated in an unreactive but soluble hydrated form. Close to cell locations where metabolic reactions require iron, they behave like a buffer storing iron to avoid overload and the resulting ROS formation and releasing iron when needed. Ferritin synthesis is encoded by *FER* genes (e.g. *FER1/2/3/4* in *Arabidopsis*). In *Arabidopsis*, AtFER2 and AtFER4 are expressed in seeds and in mitochondria, respectively (Briat et al. 2010; Jain and Connolly 2013). To avoid oxidative stress, iron is also stored in vacuoles from which it can be remobilized through family members of the NATURAL RESISTANCE-ASSOCIATED MACRO-PHAGE PROTEIN (e.g. NRAMP 3/4 in *Arabidopsis*) (Curie et al. 2000; Nevo and Nelson 2006). Candidate transporters for moving cytosolic iron into vacuoles are members of the IRT, FPN/IREG (FERROPORTIN/IRON REGULATED) and VIT (VACUOLAR IRON TRANSPORTER) families (Vert et al. 2009; Morrissey et al. 2009; Roschzttardtz et al. 2009). VIT transporters are particularly important for vacuolar iron storage in seeds (Roschzttardtz et al. 2009; Zhang et al. 2012). In the vacuole, iron is found, in specific structures called globoids, under an insoluble form poorly available for nutrition and assumed to result from complexation with phytates (Mary et al. 2015). Besides ferritins and the vacuoles, the root apoplast appears as a third level of iron storage for plants (Curie and Mari 2017). Bienfait et al. (1985) demonstrated that a pool of 500 to 1000 nanomoles of Fe per gram fresh weight was formed in the roots of bean, maize, and chlorophytum, grown in a medium containing Fe-EDTA. They further shown that bean and chlorophytum could mobilize this pool under iron starvation. In the root

apoplast, iron is adsorbed on cell wall whose net charge is negative (Shomer et al. 2003). Cell wall composition, more particularly the respective proportions of celluloses, hemicelluloses, pectins, and lignins, which vary upon plant genotypes, influences the amount of adsorbed iron (Chen 2014; Shi et al. 2018). The plant capacity to store iron in its root apoplast is positively correlated to the amount of hemicelluloses in the cell wall and would be a key determinant in the IDC tolerance of graminaceous plant species such as maize (Shi et al. 2018). IDC tolerance in soybean was also found to correlate with an increased amount of root apoplastic iron (Longnecker and Welch 1990). Phenolic compounds contribute to remobilize precipitated apoplastic iron (Jin et al. 2007; Ishimaru et al. 2011; Bashir et al. 2011; Lei et al. 2014). Remobilisation of apoplastic iron also implies the synthesis of putrescine and a decrease of cell wall suberization (Zhu et al. 2016; Curie and Mari 2017).

Mechanisms mediating plant iron acquisition also rely on cellular iron trafficking, e.g. F6'H1, PDR9, and members of the HA, FRO, and IRT family. Members of the oligopeptide transporters (OPT) protein family (e.g. YS/YSL transporters) belong to several distinct taxonomic clades and are key determinants of iron transport in planta (Su et al. 2018; Kumar et al. 2019; Grillet and Schmidt 2019). Besides their role in cytosolic transport of Fe²⁺-NA and Fe³⁺-PS, and in long-distance transport of Fe²⁺-NA, they could also contribute to other essential routes of iron traffic. For example, OP transporters are thought to be implied in signal and/or iron exchanges between the symplastic and the apoplastic path at the level of plasmodesmata that connect the cytoplasm of adjoining cells (Grillet et al. 2014). This transporter family is particularly important in the transport of Fe to the seeds (Grillet et al. 2014; Curie and Mari 2017; Su et al. 2018; Kumar et al. 2019). Basic Helix-Loop-Helix transcription factors (bHLH) regulate many genes involved in iron uptake and homeostasis. One of them (FER in tomato or FIT, FER-like Induced Transcription factor, syn. bHLH29 in *Arabidopsis*) is required in the iron deficiency response and positively regulates the transcription of genes implied in iron uptake and homeostasis by the formation of dimers with other bHLH (e.g. bHLB38 syn. ORG2, bHLB39 syn. ORG3, bHLH100, bHLH101 in *Arabidopsis*) in strategy I iron uptake. In contrast, other bHLH regulators, BTS and PYE in *Arabidopsis* (also designated by BRUTUS and POPEYE), repress the expression of iron uptake genes (Vert et al. 2009). Several of these proteins described in *Arabidopsis* are closely related to transcription regulators in rice; this analogy stressing again congruence between iron uptake strategies I

and II (Grillet and Schmidt, 2019). An additional family of peptides common to both strategies, named IROMAN (IMA) or FE-UPTAKE-INDUCING PEPTIDE (FEP), highly expressed in iron deficiency and positively regulating transcription factors, induces iron uptake genes (Hirayama et al. 2018; Grillet et al. 2018). Importance of these peptides in plant iron uptake and homeostasis remains to be disentangled.

Plant breeding. Conventional plant selection and new breeding strategies are applied to promote iron acquisition, storage and nutritional availability in edible parts of the crop. There is a natural genetic variation among plants for these traits, thus making them possible targets in breeding programs. Efficiency of plant iron nutrition is indeed highly variable in plant crops (Hansen et al. 2006). Variable levels of tolerance or susceptibility to IDC have been described between species, and within species (between cultivars) (e.g. Gildersleeve and Ocumpaugh 1989; Zribi and Gharsalli 2002; Mahmoudi et al. 2009; Helms et al. 2010). Iron content in edible parts of crop plants varies within species. For example, Fe levels in grains range from 10 to 160 mg/kg in maize, 15 to 360 mg/kg in wheat, 23 to 105 mg/kg in pea and 34 to 157 mg/kg in bean (White and Broadley 2005, 2009). A greater assimilability of Fe correlates positively with iron content in edible parts of crops (Welch et al. 2000). But it also depends upon iron forms present. Among the forms of iron commonly retrieved in vegetal products, Fe²⁺-nicotianamine (Fe²⁺-NA) and Fe³⁺-ferritin appear to be assimilable (Zielińska-Dawidziak 2015; Beasley et al. 2019). Iron nutritional availability also varies upon the presence of so-called antinutrient molecules (e.g. phytates and tanins) that may hamper iron assimilation. A decrease of these molecules is required for increasing the iron availability in food products (Sandberg 2002; Delimont et al. 2017).

Conventional breeding has allowed the selection of plant cultivars with an improved capacity to resist in iron-stressed conditions (i.e. IDC tolerant) and with an increased amount of iron in edible parts and a reduced amount of antinutriments (recently reviewed in Garcia-Oliveira et al. 2018). This approach has been especially successful for species with a high natural variability of iron content (e.g. bean and pearl millet) (Manwaring et al. 2016; Lockyer et al. 2018). Growing IDC tolerant varieties is regarded as the most reliable method to limit yield losses. However, screening of inbred lines, long and costly, remains a bottleneck.

Increased plant IDC tolerance, and iron content and assimilability in edible parts by transgenesis has been reported via overexpressing or silencing genes involved in plant iron

acquisition, transport and/or storage. The corresponding strategies targeted one or several genes in combination and allowed increase of iron content from <2 to 6-fold (Kawakami and Bhullar 2018; Connorton and Balk 2019). Despite this sharp increase, such strategies raise concerns. Public and legislative acceptations will be necessary for cultivating transgenic crop (Lassoued et al. 2018). A prerequisite would be to consistently reproduce in fields the positive effects obtained in controlled conditions, which is challenging since environmental conditions highly impact plant iron status (Gregory et al. 2017). As an example, the surexpression *FRO* in soybean significantly increased plant iron uptake in controlled iron stressed conditions (Vasconcelos et al. 2006) but not in high-calcareous soil environments (Kocak 2014) ; furthermore, this genetic transformation was even deleterious under non-iron stressed conditions due to the toxic effect of iron overload (Vasconcelos et al. 2006).

Although being promising, results of conventional plant selection and new breeding strategies, so far, highly depend on iron bioavailability in soil in which crops are grown (Gregory et al. 2017; Garcia-Oliveira et al. 2018; Lockyer et al. 2018; Connorton and Balk 2019).

Studies on the identification of QTL (quantitative trait loci) and on genome wide association (GWAS) confirmed the importance of genes previously shown to be implied in: (i) strategy I and II of iron uptake, (ii) in the production of phenolic compounds, and (iii) iron homeostasis. They further underlined the multigenic character of traits related to plant iron status and the crucial importance of environmental conditions (Garcia-Oliveira et al. 2018; Connorton and Balk 2019). Indeed, regulation mechanisms involved in plant iron nutrition, responding to environmental iron stimuli, function in close interrelation with other complex plant pathways reacting to other environmental stimuli such as phosphorus (P) and microorganisms. Numerous studies evidenced a close relation between iron and phosphorus plant status (e.g. Vansuyt et al. 2003; Tsai and Schmidt 2017; Shi et al. 2018; Filiz and Kurt 2019). Plant defense reactions, and more particularly ISR (Induced Systemic Resistance) response induced by non-pathogenic microorganisms, share common elements with iron deficiency plant response; the root specific transcription factor MYB72 and the beta-glucosidase BGLU42 are key components belonging to both pathways (Zamioudis et al. 2014). Beside regulation factors directly involved in iron cell trafficking such as bHLHs, plant iron status is also driven by plant hormone signaling. Numerous studies illustrate the importance of plant hormone signaling in plant iron physiology among which the three following

examples. First, indole acetic acid (IAA) and ethylene (Et) responsive elements have been found in the promoters of genes co-expressed under iron deficiency suggesting that they could be regulated by phytohormone responsive pathways (Li et al. 2015). Second, nitric oxide (NO), Et, and abscisic acid (ABA) are implied in the remobilization of root apoplastic iron (Lei et al. 2014; Curie and Mari 2017). Third, ABA and Et stimulate the transcription of *FIT* (Filiz and Kurt 2019).

Collectively, the complex interrelations between plant iron status, P status, defense reactions and hormone signaling, give an understanding of the difficult challenge constituted by the improvement of plant iron nutrition efficacy via plant breeding. Recent studies emphasize the importance of the plant ability to store iron in the root apoplast and of the synthesis of roots fluorescent phenolics implied in the remobilization of this extracytoplasmic iron pool. These processes, which are interrelated and remain to be further explored, have been identified as promising new breeding targets (Curie and Mari 2017; Waters et al. 2018).

Impact of microorganisms on plant iron uptake and homeostasis. Up to now, utilization of plant genetic resources for mastering plant iron status mostly did not take account of plant associated microorganisms despite growing evidence for their contribution to plant growth and health (Compant et al. 2019). A series of studies have not only shown their contribution to plant iron acquisition but also to iron repartition and speciation in planta and in seeds (**Fig. 1; Table 1**). Influence of microbial activities on plant iron metabolism is also evidenced by modification of the expression of genes directly implied in iron uptake and homeostasis such as *FIT*, *FRO* and *IRT* (**Fig. 1; Table 1**) (recently reviewed by Romera et al. 2019). These changes can be partly attributed to modification of iron availability at the root vicinity (previously presented in the paragraph 'Impact of microorganisms on iron availability to plants'). However, many other activities of ectophyte and endophyte plant associated microorganisms, may also account for modifications of plant iron status.

Plant-associated microorganisms can modify plant iron status via their influence on plant P status (**Fig. 1**). Indeed, plant iron physiology is impacted by phosphorus plant status (Tsai and Schmidt 2017; Shi et al. 2018; Filiz and Kurt 2019). Phosphate (Pi) solubilization by acidification, or siderophore production, modulates Pi availability to plants (Alori et al. 2017). Most of studies on phosphate solubilizers focus on P nutrition and global promotion of plant growth induced by diverse fungal and bacterial microorganisms (*Aspergillus*, *Azotobacter*,

Bacillus, *Burkholderia*, *Pseudomonas*, *Rhizobium*, *Saccharomyces*...); plant iron status being rarely considered. However, some studies illustrate the influence of phosphate solubilizers on plant iron status. Phosphate solubilizing microorganisms modified the partitioning of iron between roots and shoots in *Thypha angustifolia* (Ghosh et al. 2014). Plant phosphorus nutrition is also highly influenced by mycorrhizae established between plants and mycorrhizal fungi (Smith et al. 2011). Promotion of plant phosphate nutrition by an arbuscular mycorrhizal fungus (*Rhizophagus irregularis*) has been shown to impact iron nutrition of chicory (Labidi et al. 2012).

Microorganisms modifying plant hormone interplay impact plant iron physiology which is modulated by hormone signaling (**Fig. 1**) (Filiz and Kurt 2019; Lei et al. 2014; Li et al. 2015). Plant hormone signaling can be influenced by microorganisms through the elicitation of the ISR plant response which is interrelated to the plant iron deficiency response (Zamioudis et al. 2014; Romera et al. 2019). Changes in plant IAA and iron content have been observed concomitantly after bacterial inoculation demonstrating that microorganisms impact both iron nutrition and hormone signaling although mechanisms involved are not clearly identified (Zhou et al. 2016b, 2018). A rhizosphere bacterium (*Bacillus amyloliquefaciens*) has been shown to promote iron nutrition in *Arabidopsis* by the emission of Volatile Organic Compounds (VOCs). Plant NO production was required to obtain the enhancement of iron content, which clearly indicates that the bacterium promoted iron nutrition through the modulation of plant hormone signaling (Wang et al. 2017). Many beneficial root associated microorganisms are able to degrade ACC (1-aminocyclopropane-1 carboxylic acid), the precursor of ethylene (Et), via the activity of an ACC deaminase, and therefore influence ethylene level *in planta* (Ravanbakhsh et al. 2018). Et, together with abscisic acid (ABA), is a key regulator in the remobilization of root apoplastic iron under Fe shortage via the synthesis of phenolics (Curie et Mari, 2017). Production of fluorescent phenolics implied in plant remobilization of apoplastic iron, and more widely in plant iron uptake, is particularly important in alkaline conditions (Fourcroy et al. 2016; Curie and Mari 2017; Waters et al. 2018). Modulation of Et levels in roots by microorganisms can therefore influence the plant management of extracytoplasmic Fe pools under iron stressed conditions. Moreover ABA levels may also be impacted by microorganisms since this molecule, as well as other phytohormones (IAA, gibberellic acid (GA), cytokinin (CK), salicylic acid (SA), Et, and NO) can

be synthesized or degraded by soil microbes (Horchani et al. 2011; Bakker et al. 2014; Egamberdieva et al. 2017; Ravanbakhsh et al. 2018).

Microorganisms also impact the production of root phenolics and the remobilization of root apoplastic iron via the modification of phenolics synthesis. Plant growth promoting strains of fluorescent pseudomonads have been shown to enhance the synthesis of root fluorescent phenolics in *Arabidopsis* via the ISR plant response (**Fig. 1**) and the induction of the root specific transcription factor MYB72 and the MYB72-controlled beta-glucosidase BGLU42 (Zamioudis et al. 2014). Indeed, these key determinants of the ISR plant response are also key components in the synthesis and the excretion of iron-mobilizing fluorescent phenolic compounds in *Arabidopsis* grown on alkaline soil (Palmer et al. 2013). Other activities of rhizosphere microorganisms present at the root surface or in the apoplastic root compartment might also impact the plant capacity to store iron in the root apoplast and to remobilize this element. It has been shown that the composition in hemicellulose of root cell wall influenced the amount of iron stored and that putrescine, a diamine excreted by roots, is involved in iron remobilization (**Fig. 1**) (Zhu et al. 2016; Shi et al. 2018). It appears that the decomposition of cellulose and hemicellulose is commonly achieved by rhizosphere microorganisms encompassing endophytes which therefore would impact the iron storage capacity of root apoplast (Lasa et al. 2019). This hypothesis is supported by the results of a metatranscriptomic study revealing that cereal rhizospheres (wheat and oat) are enriched for cellulose degraders (Turner et al. 2013). Seemingly, putrescine has been identified as one of the most commonly used substrate by wheat rhizosphere microorganisms (Gałazka et al. 2019). Some root associated pseudomonads, able to synthesize and to acquire putrescine, would therefore be able to modify plant remobilization of apoplastic iron (Kuiper et al. 2001). Interestingly, putrescine has been identified as a signal molecule in diverse rhizosphere biotic interactions which implied pseudomonads (Kuiper et al. 2001; Song et al. 2015; Liu et al. 2018). Microorganisms may also impact plant iron status and assimilability of iron in staple food by the modification of the synthesis of phenolic compounds. Phenolic compounds such as tannic acid, shikimic acid or p-coumaric acid, belong to antinutriments that hamper assimilability of iron although they are also regarded as beneficial for food quality thanks to their antioxidant potential. Influence of microorganisms on forms and levels of phenolics in edible parts of

plants has been reported in many studies (e.g. Basha et al. 2006; Lavania et al. 2006; Baslam et al. 2011; Singh et al. 2014a; Jain et al. 2014; Baker et al. 2015).

Production of siderophores represents a major contribution of microorganisms to plant iron nutrition. Various studies report the effects of microbial siderophores (MS) on plant iron acquisition but also on iron redistribution (**Table 1**). The impact of MS is not only due to an increased availability of iron in soil. Crucial importance of these metabolites in plant-microbe interactions is illustrated by the results of root and rhizosphere microbial community studies. Protein families related to siderophore production were reported to be increased in barley root- and rhizosphere-associated bacterial taxa (Bulgarelli et al. 2015). Seemingly, sequences coding for bacterial siderophore synthesis were found to be highly enriched in a metagenomics functional study on bacterial endophytes originating from rice roots (Sessitsch et al. 2012). Microbial siderophores have been shown to impact all processes mentioned above as involved in the modulation of plant iron status (**Fig. 1**). MS influence P plant status being involved in phosphorus solubilization (Sharma et al. 2013). Microbial siderophores are implied in elicitation of plant defense reactions; they belong to MAMPs (Microbial Associated Molecular Patterns) that induce ISR plant response (De Vleeschauwer et al. 2006; Höfte and Bakker 2007; van Loon et al. 2008) and therefore modify plant iron physiology. Through the elicitation of ISR, MS also impact hormone signaling and the synthesis of fluorescent root phenolics (Pieterse et al. 2014; Zamioudis et al. 2014). In a large-scale transcriptomic analysis a model MS, a pyoverdine synthesized by a *P. fluorescens* strain (C7R12), has been shown to modulate the expression of about 2000 genes in *Arabidopsis* mostly related to iron acquisition/redistribution to the balance between plant growth and immunity (Trapet et al. 2016). In iron free conditions, addition of the apo-pyoverdine (siderophore uncomplexed with iron) restored a normal phenotype of *Arabidopsis*. In these conditions, the pyoverdine repressed the expression of root genes related to ABA signaling which suggests that the MS modulated the remobilization of root apoplastic iron which is regulated by Et and ABA (Curie et Mari, 2017; Lei et al. 2014). The existence of a non-reductive uptake system of bacterial ferrisiderophores, which is still subject to debate, would represent an additional and major influence of microorganisms on plant iron status. Various findings support the existence of a transport system by which the plant would internalize bacterial ferrisiderophores in the form of integral ferric chelates. Pyoverdines of fluorescent pseudomonads chelated to iron (Fe^{3+} -

pvd) were shown to contribute to plant iron nutrition of both dicotyledons (strategy I) and graminaceous monocotyledons (strategy II) more efficiently than synthetic ferric chelate (Fe³⁺-EDTA) (Vansuyt et al. 2007; Jin et al. 2010; Shirley et al. 2011). The stability constant of the complex Fe³⁺ and the MS pyoverdine, (10^{32}), is significantly higher than that of Fe³⁺-EDTA (10^{25}) or Fe-PS (10^{18}) (Vansuyt et al. 2007 ; Shirley et al. 2011). This suggested that dissociation or ligand exchange between Fe³⁺-pvd and Fe³⁺-PS could be excluded to explain the enhanced iron nutrition by Fe-MS and thus the possible incorporation of Fe³⁺-pvd by roots. This was confirmed by measurements of ¹⁵N-labeled Fe³⁺-pvd *in planta* and by immunodetection using anti-pyoverdine antibodies (Vansuyt et al. 2007; Trapet et al. 2016). It was further demonstrated that the membrane transporter of Fe²⁺ in strategy I plants (IRT1) was not involved in iron uptake from Fe³⁺-pvd (Vansuyt et al. 2007). Taken together, these results have demonstrated (i) that iron from Fe³⁺-pvd can be used by the plant and (ii) the incorporation of pyoverdine, but have not provided direct evidence for uptake of the entire Fe³⁺-pvd complex. The recent description of a non-reductive iron uptake system in a phytoplankton organism supports the hypothesis according to which superior plants could have kept the ability to scavenge bacterial ferrisiderophores through evolution (Kazamia et al. 2018). Formation of vesicles, involved in the internalization by endocytosis of ferrisiderophores in diatoms, has also been observed in *Arabidopsis* supplemented with Fe-pvd (Avoscan et al. unpublished data) reinforcing the hypothesis.

4. Intercropping

Intercropping, in which at least two plant species are grown together in a same field, is used to improve crop yield and quality in low-input agricultural systems by valuing beneficial plant-plant and plant-microorganisms biotic interactions. Plant-microbe interactions impact the issue of the interactions between plants. So far, plant-microorganisms interactions purposely used mostly concerns the symbiotic relationship between nitrogen-fixing soil bacteria and legumes. In an intercropped system the presence of a legume, able to use atmospheric nitrogen, decreases the competition for soil nitrogen and benefits to associated non-legume crop species such as graminaceous by resource partitioning. Labeling studies showed that N acquired by fixation by a legume can be retrieved in an intercropped cereal which therefore benefits from nutriment acquisition facilitation (Duchene et al. 2017). Several

studies reviewed by Xue et al. (2016) and Dai et al. (2019) reported an increased tolerance to IDC of legumes or of non-legume dicotyledons in alkaline growing environments when associated with a cereal in intercropping systems, suggesting a better iron nutrition in dicotyledons, strategy I plants for iron uptake. An intercropping system with grass was even more efficient than addition of iron chelates for improving yields of blueberries on sub-alkaline soil since a better crop load (number of fruits per plant) and fruit quality (as expressed by the skin/flesh ratio) could be obtained (Michel et al. 2019). This enhanced nutrition of dicotyledons also led to an increased iron content as shown in calcareous soil with peanut seeds which had 1.43 fold more iron when peanuts were intercropped with maize (Zuo and Zhang 2009). However, results obtained may suffer from lack of consistency. For example, an intercropping system with oat was as good as in-furrow amendment with Fe Chemical chelate (FeDDHA) for alleviating soybean IDC on calcareous soils (Kaiser et al. 2014). However, depending on environmental conditions, variations could be observed and Fe amendment, more reliable, was recommended to growers. Better knowledge of biotic interactions implied is therefore required to increase the reproducibility of the results and allow the development of these environmentally friendly culture systems.

Regarding iron uptake, three mechanisms of facilitation may account for the enhancement of iron nutrition in dicotyledons in the presence of graminaceous crop plants.

The first would rely on the iron extraction of iron by chelation with PS from grasses that would increase iron availability to dicotyledons as shown when intercropping olive (Cañasveras et al. 2014) and citrus rootstocks (Cesco et al. 2006) with grasses. Intercropping was shown to impact PS production and expression of *FRO* and *IRT* genes implied in strategy I iron uptake system although this trend seems to be not consistent according to the studies (Dai et al. 2019).

A second mechanism would rely on a non-reductive mechanism used by dicotyledons to incorporate Fe-PS excreted by grasses. Fe-PS from a strategy II plant (maize) was internalized by a strategy I plant (peanut) (Xiong et al. 2013) via a membrane transporter belonging to the YS/YSL family of Fe-PS transporters (Curie et al. 2000, 2009).

Finally, the third mechanism enhancing iron uptake in dicotyledons intercropped with maize could rely on the remobilization of apoplastic iron by root phenolic compounds. Under

Fe deficiency, maize was unable to remobilize its pool of root apoplastic iron, contrary to bean (Bienfait et al. 1985). In addition, Fe-deficient bean plants were shown to mobilize iron from the root apoplast of another plant grown in the same vessel (Bienfait et al. 1985). In alkaline conditions, an increased synthesis of root fluorescent phenolics will help dicotyledons to mobilize iron from the rhizosphere (Waters et al. 2018). One might therefore expect that the non-used root apoplastic iron pool of maize roots, could be remobilized by an associated dycotyledon crop. This could partly account for the important number of successful results obtained when legumes are intercropped with maize (Xue et al. 2016; Dai et al. 2019).

In addition to the enhanced iron uptake, intercropping may improve plant iron nutrition by modulating plant iron repartition (Xue et al. 2016). This modulation seems even to account for variation in IDC tolerance among cultivars when cultivated together with graminaceous plants (Jelali et al. 2010; Santos et al. 2015).

Importance of microorganisms on plant iron nutrition in intercropping. Microbial abundance, diversity, and activity are promoted by intercropping (Xue et al. 2016; Li et al. 2016, 2018; Duchene et al. 2017; Zaeem et al. 2019).

Rhizosphere microbial communities associated with plant species cultivated separately or in association differ with modifications of the occurrence of dominant microbial taxa. Presence of Alpha-Proteobacteria and Acidobacteria decreased while that of Actinobacteria increased when intercropping wheat and pea (Taschen et al. 2017). Beneficial effects of intercropping seems to be maintained for maize and peanut even when plants are separated by a nylon-net avoiding direct root interactions but still allowing exchanges of fluids and microorganisms (Li et al. 2018). Compared to monocultures, comparable microbial communities were observed whether roots were separated or not, *Bacillus*, *Brevibacillus*, and *Paenibacillus* were mainly increased in the maize rhizosphere, while *Burkholderia*, *Pseudomonas*, and *Rhizobium* were mainly increased in the peanut rhizosphere. In these conditions, availability of nutrients (N and P) was increased (Li et al. 2018). However, data regarding modification of microbial activities are required to progress into the knowledge of mechanisms that would be implied in the promotion of plant growth.

Changes in rhizosphere microbial communities due do intercropping necessarily impacts microbial activities and thus, plant iron status. Therefore, knowledge integrating

plant-plant and plant-microorganisms interactions is missing. Additional data on plant iron content will also be required since, up to now, effect of intercropping has been mostly evaluated by visually recording the importance of IDC symptoms.

5. New perspectives for iron biofortification

Importance of microorganisms on plant nutrition, including iron nutrition, is widely recognized. However, up to now microorganisms are mostly regarded as biofertilizers. They are applied to plants in different kinds of formulations containing one or several microorganisms (Mehnaz 2016). Good results can be obtained, in particular when root symbionts are absent from the plant growing environment such as in the case of soybean crops out of Asia which are inoculated with the bacterial nitrogen fixing partner of the plant, *Bradyrhizobium japonicum*. However, apart from such specific situations, these approaches do not take into account the high specificity of plant-microorganisms interactions, their pleiotropic effects on plant physiology, and the determinant importance of environmental factors that include the soil microbiota. This leads to variable results and limits the added value of these essential biotic interactions.

This review highlighted the effects of microorganisms on plant iron status, the mechanisms implied, and also presented hypothetical means of influence of microbes on plant iron physiology raised in the literature but remaining to be explored (**Fig. 1**). Microorganisms can influence iron bioavailability for plants, plant iron uptake, repartition in plant tissues and seeds, and assimilability in staple food. Various items particularly interesting regarding biofortification of plants in iron may be underlined. Iron bioavailability can be modified near, but also within the roots (i.e. in the apoplast). Iron is solubilized via acidification and chelation especially by microbial siderophores. By chelating iron, siderophores contribute to P solubilization and impact P plant nutrition known to modulate iron nutrition. Several microbial siderophores, synthesized by fluorescent pseudomonas, trigger ISR plant defense response and modify the regulation of iron nutrition via plant hormone signaling. Siderophores may contribute to plant iron nutrition more efficiently than chemical chelates. Ferrisiderophores are suspected to be uptaken by plants through a non-reductive system. Microorganisms may further influence root synthesis of fluorescent phenolics and of the remobilization of root apoplastic iron, both implied in plant tolerance to IDC in alkaline environments. The

corresponding plant traits represent promising new breeding targets influenced by microorganisms, and more specifically (i) the synthesis pathway of fluorescent phenolics and plant defense response sharing common key components triggered by microorganisms, (ii) the plant capacity of iron storage in root apoplast as regulated by microbial degradation of lignocellulosic substances, and (iii) microbial putrescine synthesis and degradation may interfere with plant putrescine synthesis as required for apoplastic iron remobilization.

Plant impacts rhizosphere microbiota and in return rhizosphere microbiota impacts plant iron physiology, this feedback being modulated by both soil physico-chemical properties and plant genotype (**Fig. 2**). Numerous studies have now demonstrated that plants shape the composition of their microbiota and that the plant recruitment is genotype dependent (Jones et al. 2019; Rodriguez et al. 2019). Plants manage their rhizosphere microbiota via rhizodeposition including root exudation, and by influencing gradients of nutrients (Badri et al. 2013; Lemanceau et al. 2017; Canarini et al. 2019). Plant growth and health might therefore depend on this management of the rhizosphere microbiota. Iron hyperaccumulation by a transgenic tobacco deregulated in the ferritin synthesis led both to a depletion of that element in the rhizosphere and to the selection of pseudomonads populations highly competitive producing specific siderophores (Robin et al. 2006, 2007). Seemingly, due to an increased synthesis of root phenolics, microorganisms from the rhizosphere of Fe-deficient clover grown in calcareous soil displayed a greater capacity to secrete siderophores than rhizosphere microorganisms of clover supplemented in iron (Jin et al. 2010). In both cases the Fe-chelating ability of the rhizosphere microbiota has been modified by plant iron status (**Fig. 2**). It appears that both iron depletion induced by a transgenic tobacco, and root phenolics excreted by Fe-deficient clover, whose effects might even well be combined, are involved in the modification of siderophore production in the rhizosphere (Jin et al. 2007, 2010; Robin et al. 2006, 2007). Besides the promotion of a particular fraction of the rhizosphere microbiota presenting an increased ability to survive iron depletion, another fraction is likely to have been starved via competition for iron or killed by toxicity (**Fig. 2**). Indeed, phenolic compounds such as scopoletin are known to display antimicrobial activity (Gnonlonfin et al. 2012). The biomass of counter selected microbes represents a potential pool of iron and of other nutrients. Thus, in

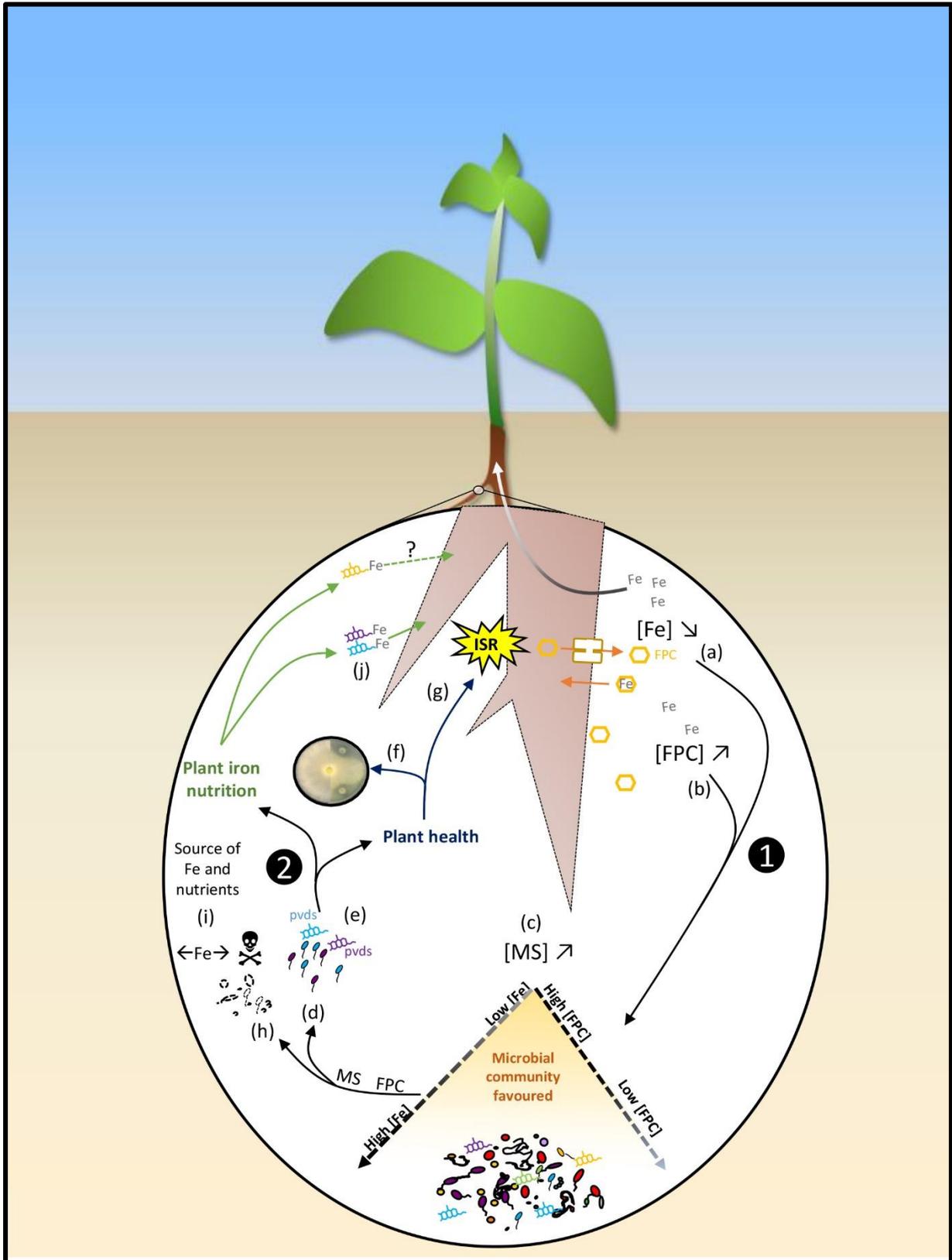


Fig. 2 Feedback loop schematically summarizing rhizosphere plant-microbiota interactions in relation to iron. ① Plant iron status shapes the rhizosphere microbiota. A decrease of iron bioavailability ($[Fe] \downarrow$) due to an increase of plant Fe uptake (a) (Robin et al. 2006; 2007), and excretion of root phenolic compounds (FPC), contributing to plant iron uptake and enhanced in calcareous soils ($[FPC] \uparrow$) showing low iron availability ($[Fe] \downarrow$) (b) (Jin et al. 2010; Stringlis et al. 2018), are implied in this effect. The production of microbial siderophores is increased ($[MS] \uparrow$) in the rhizosphere of iron stressed plants (c) (Jin et al. 2010) and pseudomonads globally more able to resist Fe deficiency are favoured (d) (Robin et al. 2007). Pseudomonads producing specific pyoverdine siderophores (pvds) are recruited (e) (Robin et al. 2007; Stringlis et al. 2018). ② In return, rhizosphere microbiota recruited in the rhizosphere of iron stressed plants can positively influence plant health and iron nutrition. Some specific pvds produced by rhizosphere pseudomonads can display high antagonistic abilities, due to iron competition, against an oomycete phytopathogen (*Pythium*) (f) (Robin et al. 2007) and some others can trigger plant induced systemic resistance (ISR) (g) (Stringlis et al. 2018). Fungal phytopathogens (*Fusarium*) can be counter selected by FPC (h) (Stringlis et al. 2018). Microflora counter selected by competition for iron ($\leftarrow Fe \rightarrow$) or by toxicity (\otimes) of FPC or microbial siderophores (i) constitutes a source of iron and of other nutrients. Siderophores produced by a pseudomonad strain recruited in the rhizosphere of an iron stressed plant can favour plant iron nutrition (j) (Jin et al. 2010). However, given the huge diversity of pseudomonads siderophores, and in particular of pyoverdines that display a high affinity to iron, the question remains (?) if distinct pvds would differently favour plant iron nutrition and therefore if pseudomonads recruited in a plant microbiota effectively promote iron nutrition

addition to iron stored in ferritins, in the vacuoles and in the root apoplastic compartment, the root microbiota might be used as a fourth level of iron storage by plants. Interestingly, important phytopathogens are concerned by changes observed in the rhizosphere microbiota. Particular siderophores presenting a very high affinity for iron retrieved in the rhizosphere of an overexpressing ferritin transgenic tobacco displayed a high antagonistic activity against a phytopathogenic oomycete (*Pythium aphanidermatum*) (Robin et al. 2007) (**Fig. 2**). Stringlis et al. (2018) also showed that root fluorescent phenolic compounds, synthesized through a MYB72-dependent pathway, selectively inhibited the soil-borne fungal pathogens *Fusarium oxysporum* and *Verticillium dahliae*, while the growth promoting and ISR inducing *Pseudomonas simiae* WCS417 and *Pseudomonas capeferrum* WCS358 are highly tolerant of the antimicrobial effect of root phenolics (**Fig. 2**). These strains promote plant growth and health through siderophore mediated competition for iron (Berendsen et al. 2015). Siderophores synthesized by a *Pseudomonas* strain originating from the rhizosphere of Fe-deficient clover promoted iron nutrition (Jin et al., 2010). However, given the huge diversity of microbial siderophores, and in particular of pyoverdines that display a high affinity to iron, the question remains if distinct pvds would differently favour plant iron nutrition and therefore if pseudomonads recruited in a plant microbiota would effectively promote iron nutrition more efficiently than others (**Fig. 2**). Thus, if on the one hand, microorganisms impact plant iron physiology, on the other hand, plant iron status impacts microbial traits involved in rhizosphere iron dynamics. This illustrates for iron that, according to a conceptual scheme of a feedback loop, the reciprocal influence of the host plant and of its microbiota on plant health and iron nutrition (**Fig. 2**) and stresses the importance of considering the plant together with its microbiota in future research on plant iron biofortification.

Further research is required to disentangle plant-microbiota interactions and their role in iron nutrition. Intercropping systems may represent an opportunity for promoting plant iron nutrition, still mechanisms underlying this positive effect remain largely unknown. Progresses are needed to better exploit the corresponding interplay of beneficial biotic interactions. Most of findings on microbial influence on plant iron comes from studies focusing on soil and rhizosphere interactions. Yet, the phyllosphere and spermosphere microbiota, whose influence has long been underestimated, might also influence iron physiology

(Lemanceau et al. 2017a). Iron can be absorbed by leaves and various studies demonstrated the existence of a signal, originating from shoots and involving IAA, eliciting iron translocation from roots to shoots (Kabir et al. 2013; Garnica et al. 2018). Importance of the shoot microbiota on these components of plant iron dynamics remains to be explored. The spermosphere microbiota is at least partly inherited from parent plants (Lemanceau et al. 2017a). It would be therefore essential to evaluate the role of corresponding microorganisms, which are directly concerned by breeding programs. Studies on plant microbiota mostly provide taxonomic descriptions of plant associated microorganisms. Results obtained are therefore deeply influenced by the soil microbiota, highly depending on pedologic and climatic factors, in which the plant recruits a major part of its spermosphere, rhizosphere and phyllosphere microbiota (Dequiedt et al. 2009; Xue et al. 2018). Consequently, identification of microorganisms favorable to plant growth and health is largely hampered. Indeed, as suggested by findings accumulated for years on plant growth promoting microorganisms, microbial traits implied in beneficial plant-microbe interactions (production of siderophores, hormones, antibiotic molecules, HCN...) are very diverse and found in distinct microbial taxa. A deeper knowledge on interactions between beneficial effects on plant growth and health and microbial functional diversity is therefore required (Lemanceau et al. 2017b). Indeed, it has recently been shown that isomeric forms of a specific VOC, reportedly produced by specific types of bacteria, could elicit differently plant defense responses (Kong et al. 2018). Seemingly, the ISR eliciting ability of various pseudomonads siderophores has been shown to differ (van Loon et al. 2008). Many studies stressed the importance of microbial siderophores in plant iron status via several modes of action. Considering the huge structural and functional diversity already described for these molecules, results regarding their diversity on plant iron status would allow identifying beneficial patterns of association with plants and therefore select plant genotypes favoring their recruitment.

Increasing knowledge on interactions between eukaryotic organisms and their associated microbiota led to the emergence of the holobiont concept, defined as the host plus all its associated microbes (Vandenkoornhuysen et al. 2015; Theis et al. 2016). The plant and its associated microbiota are now regarded as a holobionte (Vanderkoornhuysen et al. 2015). Because of the importance of its associated microbiota, in terms of abundance, diversity and beneficial effects for the host plant, plants can no longer be considered as stand-alone entities

(Dessaux et al. 2016). According to this concept, the genome interacting with its environment is no more restricted to the plant genome but is the genome of the holobionte, the hologenome (Theis et al. 2016). Therefore, one might consider utilizing holobionte genetic resources for improving the holobionte iron status. Several studies report the importance of taking into account the plant microbiota in breeding programs and breeding strategies enabling the transmission of a part, or of the entire plant microbiota, have been proposed (Gopal and Gupta 2016; Wei and Jousset 2017; Berg and Raaijmakers 2018). Recently, Wille et al. (2019) presented a comprehensive review of plant-microbe interaction implied in resistance to root diseases in grain legumes and discussed the adaptation of breeding strategies. They finally propose to consider the entire plant holobiont in resistance breeding strategies. This conclusion, similar to ours, sounds logical considering the complexity and the importance of plant-microorganisms interactions on plant growth and health. However, in these promising approaches, it would be important to widen the objectives and develop more integrative studies. Indeed, potential trade-offs are already known. Breeding programs focusing on plant health promotion could be detrimental to plant growth and also impact plant iron status and vice versa. Seemingly increasing plant iron content also more globally impacts plant ionome (Cohen et al. 1998). This might be favorable to other essential micronutrients like Zn, but this could also lead to accumulation of toxic elements due to variable specificity of plant iron transporters (Rajkumar et al. 2010; de Valença et al. 2017). Another trade-off is constituted by the presence of some phenolic antioxidant compounds, interesting for human health, but decreasing iron assimilability as antinutrients. The selection of new genotypes should thereby be no more oriented towards the production of plants harboring specific characters. Plant improvement strategies should rather consider the extended genotype formed by the plant and its specific microbiota and search for combinations allowing the holobionte to quickly adapt to a panel of important biotic and abiotic stresses that might occur for a particular crop. One might rather tend towards the research of 'ideoholotypes'.

6. References

- Abadía J, Vázquez S, Rellán-Álvarez R, et al (2011) Towards a knowledge-based correction of iron chlorosis. *Plant Physiol Biochem* 49:471–482. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2011.01.026>
- Adeleke R, Nwangburuka C, Oboirien B (2017) Origins, roles and fate of organic acids in soils: A review. *S Afr J Bot* 108:393–406. <https://doi.org/10.1016/j.sajb.2016.09.002>
- Aisen P, Enns C, Wessling-Resnick M (2001) Chemistry and biology of eukaryotic iron metabolism. *Int J Biochem Cell Biol* 33:940–959. [https://doi.org/10.1016/s1357-2725\(01\)00063-2](https://doi.org/10.1016/s1357-2725(01)00063-2)
- Albrecht-Gary AM, Crumbliss AL (1998) Coordination chemistry of siderophores: thermodynamics and kinetics of iron chelation and release. *Met Ions Biol Syst* 35:239–327
- Alori ET, Glick BR, Babalola OO (2017) Microbial phosphorus solubilization and its potential for use in sustainable agriculture. *Front Microbiol* 8:971. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.00971>
- Badri DV, Chaparro JM, Zhang R, et al (2013) Application of natural blends of phytochemicals derived from the root exudates of *Arabidopsis* to the soil reveal that phenolic-related compounds predominantly modulate the soil microbiome. *J Biol Chem* 288:4502–4512. <https://doi.org/10.1074/jbc.M112.433300>
- Bailey RL, Jr KPW, Black RE (2015) The epidemiology of global micronutrient deficiencies. *Ann Nutr Metab* 66:22–33. <https://doi.org/10.1159/000371618>
- Baker CJ, Mock NM, Smith JM, Aver'Yanov AA (2015) The dynamics of apoplast phenolics in tobacco leaves following inoculation with bacteria. *Front Plant Sci* 6:649. <https://doi.org/10.3389/fpls.2015.00649>
- Bakker PAHM, Ran L, Mercado-Blanco J (2014) Rhizobacterial salicylate production provokes headaches! *Plant Soil* 382:1–16. <https://doi.org/10.1007/s11104-014-2102-0>
- Balk J, Schaedler TA (2014) Iron cofactor assembly in plants. *Annu. Rev. Plant Biol.* 65:125–153. <https://doi.org/10.1146/annurev-arplant-050213-035759>
- Bar-Ness E, Hadar Y, Chen Y, et al (1992) Iron uptake by plants from microbial siderophores: a study with 7-nitrobenz-2 oxa-1,3-diazole-desferrioxamine as fluorescent ferrioxamine B analog. *Plant Physiol* 99:1329–1335. <https://doi.org/10.1104/pp.99.4.1329>
- Basha SA, Sarma BK, Singh DP, et al (2006) Differential methods of inoculation of plant growth-promoting rhizobacteria induce synthesis of phenylalanine ammonia-lyase and phenolic compounds differentially in chickpea. *Folia Microbiol (Praha)* 51:463–468. <https://doi.org/10.1007/bf02931592>
- Bashir K, Ishimaru Y, Nishizawa NK (2010) Iron uptake and loading into Rice Grains. *Rice* 3:122–130. <https://doi.org/10.1007/s12284-010-9042-y>
- Bashir K, Ishimaru Y, Shimo H, et al (2011) Rice phenolics efflux transporter 2 (PEZ2) plays an important role in solubilizing apoplasmic iron. *J Soil Sci Plant Nutr* 57:803–812. <https://doi.org/10.1080/00380768.2011.637305>
- Baslam M, Garmendia I, Goicoechea N (2011) Arbuscular mycorrhizal fungi (AMF) improved growth and nutritional quality of greenhouse-grown lettuce. *J Agr Food Chem* 59:5504–5515. <https://doi.org/10.1021/jf200501c>
- Beasley JT, Hart JJ, Tako E, et al (2019) Investigation of nicotianamine and 2' deoxymugineic acid as enhancers of iron bioavailability in caco-2 cells. *Nutrients* 11:1502. <https://doi.org/10.3390/nu11071502>
- Becker JO, Hedges RW, Messens E (1985b) Inhibitory effect of pseudobactin on the uptake of iron by higher plants. *Appl Environ Microbiol* 49:1090–1093
- Becker JO, Messens E, Hedges RW (1985a) The influence of agrobactin on the uptake of ferric iron by plants. *FEMS Microbiol Ecol* 31:171–175
- Berendsen RL, van Verk MC, Stringlis IA, et al (2015) Unearthing the genomes of plant-beneficial *Pseudomonas* model strains WCS358, WCS374 and WCS417. *BMC Genomics* 16:539. <https://doi.org/10.1186/s12864-015-1632-z>

- Berg G, Raaijmakers JM (2018) Saving seed microbiomes. *Int Soc Microbial Ecol J* 12:1167–1170. <https://doi.org/10.1038/s41396-017-0028-2>
- Bienfait HF, Briel W van den, Mesland-Mul NT (1985) Free space iron pools in roots: Generation and Mobilization. *Plant Physiol* 78:596–600. <https://doi.org/10.1104/pp.78.3.596>
- Briat J-F, Dubos C, Gaymard F (2015) Iron nutrition, biomass production, and plant product quality. *Trends Plant Sci* 20:33–40. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2014.07.005>
- Rene M. Boiteau, Lye M. Markillie, Hugh D. Mitchell, Dehong Hu, Rosalie K. Chu, David W. Hoyt, Ljiljana Pasa-Tolic, Janet K. Jansson, Christer Jansson, Phytosiderophore piracy by soil bacteria. *Int. Soc. Microbial Ecol. J.* in press
- Briat J-F, Ravet K, Arnaud N, et al (2010) New insights into ferritin synthesis and function highlight a link between iron homeostasis and oxidative stress in plants. *Ann Bot* 105:811–822. <https://doi.org/10.1093/aob/mcp128>
- Budzikiewicz H (2004) Siderophores of the Pseudomonadaceae sensu stricto (fluorescent and non-fluorescent *Pseudomonas* spp.). *Fortschr Chem Org Naturst* 87:81–237. https://doi.org/doi.org/10.1007/978-3-7091-0581-8_2
- Bulgarelli D, Garrido-Oter R, Münch PC, et al (2015) Structure and function of the bacterial root microbiota in wild and domesticated barley. *Cell Host & Microbe* 17:392–403. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2015.01.011>
- Canarini A, Kaiser C, Merchant A, et al (2019) Root exudation of primary metabolites: mechanisms and their roles in plant responses to environmental stimuli. *Front Plant Sci* 10:157. <https://doi.org/10.3389/fpls.2019.00157>
- Cañasveras JC, del Campillo MC, Barrón V, Torrent J (2014) Intercropping with grasses helps to reduce iron chlorosis in olive. *J Soil Sci Plant Nutr* 14:554–564. <https://doi.org/10.4067/S0718-95162014005000044>
- Carrillo-Castañeda G, Muñoz JJ, Peralta-Videa JR, et al (2005) Modulation of uptake and translocation of iron and copper from root to shoot in common bean by siderophore-producing microorganisms. *J Plant Nutr* 28:1853–1865. <https://doi.org/10.1080/01904160500251340>
- Cesco S, Rombolà AD, Tagliavini M, et al (2006) Phytosiderophores released by graminaceous species promote 59Fe-uptake in citrus. *Plant Soil* 287:223–233. <https://doi.org/10.1007/s11104-006-9069-4>
- Chasapis CT, Loutsidou AC, Spiliopoulou CA, Stefanidou ME (2012) Zinc and human health: an update. *Arch Toxicol* 86:521–534. <https://doi.org/10.1007/s00204-011-0775-1>
- Chen H (2014) Chemical composition and structure of natural lignocellulose. In: Chen H (ed) *Biotechnology of lignocellulose: theory and practice*. Springer Netherlands, Dordrecht, pp 25–71
- Chen L, Dick WA, Streeter JG (2000) Production of aerobactin by microorganisms from a compost enrichment culture and soybean utilization. *J Plant Nutr* 23:2047–2060. <https://doi.org/10.1080/01904160009382164>
- Chen Y, Barak P (1982) Iron nutrition of plants in calcareous soils. In: *Advances in Agronomy*. Elsevier, pp 217–240
- Cohen CK, Fox TC, Garvin DF, Kochian LV (1998) The role of iron-deficiency stress responses in stimulating heavy-metal transport in plants. *Plant Physiol* 116:1063–1072. <https://doi.org/10.1104/pp.116.3.1063>
- Colombo C, Palumbo G, He J-Z, et al (2014) Review on iron availability in soil: interaction of Fe minerals, plants, and microbes. *Journal of Soils and Sediments* 14:538–548. <https://doi.org/10.1007/s11368-013-0814-z>
- Compant S, Samad A, Faist H, Sessitsch A (2019) A review on the plant microbiome: Ecology, functions, and emerging trends in microbial application. *J Adv Res* 19:29–37. <https://doi.org/10.1016/j.jare.2019.03.004>
- Connorton JM, Balk J (2019) Iron biofortification of staple crops: lessons and challenges in plant genetics. *Plant Cell Physiol* pcz079. <https://doi.org/10.1093/pcp/pcz079>
- Connorton JM, Balk J, Rodríguez-Celma J (2017) Iron homeostasis in plants – a brief overview. *Metallomics* 9:813–823. <https://doi.org/10.1039/C7MT00136C>

- Cross AJ, Harnly JM, Ferrucci LM, et al (2012) Developing a heme iron database for meats according to meat type, cooking method and doneness level. *Food Nutr Sci* 3:905–913. <https://doi.org/10.4236/fns.2012.37120>
- Crowley DE (2006) Microbial siderophores in the plant rhizosphere. In: Barton LL, Abadia J (eds) *Iron nutrition in plants and rhizospheric microorganisms*. Springer Netherlands, Dordrecht, pp 169–198
- Crowley DE, Reid CP, Szaniszlo PJ (1988) Utilization of microbial siderophores in iron acquisition by oat. *Plant Physiol* 87:680–685. <https://doi.org/doi.org/10.1104/pp.87.3.680>
- Curie C, Alonso JM, Jean ML, et al (2000) Involvement of NRAMP1 from *Arabidopsis thaliana* in iron transport. *Biochem J* 347:749–755. <https://doi.org/10.1042/bj3470749>
- Curie C, Briat J-F (2003) Iron transport and signaling in plants. *Annu Rev Plant Biol* 54:183–206. <https://doi.org/10.1146/annurev.arplant.54.031902.135018>
- Curie C, Cassin G, Couch D, et al (2009) Metal movement within the plant: contribution of nicotianamine and yellow stripe 1-like transporters. *Ann Bot* 103:1–11. <https://doi.org/10.1093/aob/mcn207>
- Curie C, Mari S (2017) New routes for plant iron mining. *New Phytol* 214:521–525. <https://doi.org/10.1111/nph.14364>
- Dai J, Qiu W, Wang N, et al (2019) From Leguminosae/Gramineae intercropping systems to see benefits of intercropping on iron nutrition. *Front Plant Sci* 10:605. <https://doi.org/10.3389/fpls.2019.00605>
- de Santiago A, García-López AM, Quintero JM, et al (2013) Effect of *Trichoderma asperellum* strain T34 and glucose addition on iron nutrition in cucumber grown on calcareous soils. *Soil Biol Biochem* 57:598–605. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2012.06.020>
- de Santiago A, Perea-Torres F, Avilés M, et al (2019) Shifts in microbial community structure influence the availability of Fe and other micronutrients to lupin (*Lupinus albus* L.). *Applied Soil Ecology* 144:42–50. <https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2019.06.018>
- de Santiago A, Quintero JM, Avilés M, Delgado A (2009) Effect of *Trichoderma asperellum* strain T34 on iron nutrition in white lupin. *Soil Biol Biochem* 41:2453–2459. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2009.07.033>
- de Valença AW, Bake A, Brouwer ID, Giller KE (2017) Agronomic biofortification of crops to fight hidden hunger in sub-Saharan Africa. *Glob Food Secur* 12:8–14. <https://doi.org/10.1016/j.gfs.2016.12.001>
- De Vleeschauwer D, Cornelis P, Höfte M (2006) Redox-active pyocyanin secreted by *Pseudomonas aeruginosa* 7NSK2 triggers systemic resistance to *Magnaporthe grisea* but enhances *Rhizoctonia solani* susceptibility in rice. *Mol Plant Microbe In* 19:1406–1419. <https://doi.org/10.1094/MPMI-19-1406>
- Dehner CA, Awaya JD, Maurice PA, DuBois JL (2010) Roles of siderophores, oxalate, and ascorbate in mobilization of iron from hematite by the aerobic bacterium *Pseudomonas mendocina*. *Appl Environ Microbiol* 76:2041–2048. <https://doi.org/10.1128/AEM.02349-09>
- Delimont NM, Haub MD, Lindshield BL (2017) The impact of tannin consumption on iron bioavailability and status: a narrative review. *Curr Dev Nutr* 1:1–12. <https://doi.org/10.3945/cdn.116.000042>
- Dequiedt S, Thioulouse J, Jolivet C, et al (2009) Biogeographical patterns of soil bacterial communities. *Environ Microbiol Rep* 1:251–255. <https://doi.org/10.1111/j.1758-2229.2009.00040.x>
- Dessaux Y, Grandclément C, Faure D (2016) Engineering the rhizosphere. *Trends Plant Sci* 21:266–278. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2016.01.002>
- Duchene O, Vian J-F, Celette F (2017) Intercropping with legume for agroecological cropping systems: complementarity and facilitation processes and the importance of soil microorganisms. A review. *Agriculture, Ecosystems & Environment* 240:148–161. <https://doi.org/10.1016/j.agee.2017.02.019>
- Duijff BJ, De Kogel WJ, Bakker PAHM, Schippers B (1994) Influence of pseudobactin 358 on the iron nutrition of barley. *Soil Biol Biochem* 26:1681–1688. [https://doi.org/10.1016/0038-0717\(94\)90321-2](https://doi.org/10.1016/0038-0717(94)90321-2)
- Egamberdieva D, Wirth SJ, Alqarawi AA, et al (2017) Phytohormones and beneficial microbes: essential components for plants to balance stress and fitness. *Front Microbiol* 8:2104. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.02104>

- Fan M-S, Zhao F-J, Fairweather-Tait SJ, et al (2008) Evidence of decreasing mineral density in wheat grain over the last 160 years. *J Trace Elem Med Bio* 22:315–324. <https://doi.org/10.1016/j.jtemb.2008.07.002>
- Ferreira CMH, Sousa CA, Sanchis-Pérez I, et al (2019) Calcareous soil interactions of the iron(III) chelates of DPH and Azotochelin and its application on amending iron chlorosis in soybean (*Glycine max*). *Sci Total Environ* 647:1586–1593. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.08.069>
- Ferret C, Sterckeman T, Cornu J-Y, et al (2014) Siderophore-promoted dissolution of smectite by fluorescent *Pseudomonas*. *Env Microbiol Rep* 6:459–467. <https://doi.org/10.1111/1758-2229.12146>
- Filiz E, Kurt F (2019) FIT (Fer-like iron deficiency-induced transcription factor) in plant iron homeostasis: genome-wide identification and bioinformatics analyses. *J Plant Biochem Biotechnol* 28:143–157. <https://doi.org/10.1007/s13562-019-00497-0>
- Finkelstein JL, Fothergill A, Hackl LS, et al (2019) Iron biofortification interventions to improve iron status and functional outcomes. *Proc Nutr Soc* 78:197–207. <https://doi.org/10.1017/S0029665118002847>
- Finkelstein JL, Haas JD, Mehta S (2017) Iron-biofortified staple food crops for improving iron status: a review of the current evidence. *Curr Opin Biotech* 44:138–145. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2017.01.003>
- Fourcroy P, Sisó-Terraza P, Sudre D, et al (2014) Involvement of the ABCG37 transporter in secretion of scopoletin and derivatives by *Arabidopsis* roots in response to iron deficiency. *New Phytol* 201:155–167. <https://doi.org/10.1111/nph.12471>
- Fourcroy P, Tissot N, Gaymard F, et al (2016) Facilitated Fe nutrition by phenolic compounds excreted by the *Arabidopsis* ABCG37/PDR9 transporter requires the IRT1/FRO2 high-affinity root Fe²⁺ transport system. *Mol Plant* 9:485–488. <https://doi.org/doi:10.1016/j.molp.2015.09.010>
- Freitas MA, Medeiros FHV, Carvalho SP, et al (2015) Augmenting iron accumulation in cassava by the beneficial soil bacterium *Bacillus subtilis* (GBO3). *Front Plant Sci* 6:596. <https://doi.org/10.3389/fpls.2015.00596>
- Frey B, Rieder SR, Brunner I, et al (2010) Weathering-associated bacteria from the Damma glacier forefield: physiological capabilities and impact on granite dissolution. *Appl Environ Microbiol* 76:4788–4796. <https://doi.org/10.1128/AEM.00657-10>
- Gałązka A, Grzęda E, Jończyk K (2019) Changes of microbial diversity in rhizosphere soils of new quality varieties of winter wheat cultivation in organic farming. *Sustainability* 11:4057. <https://doi.org/10.3390/su11154057>
- Garcia-Oliveira AL, Chander S, Ortiz R, et al (2018) Genetic basis and breeding perspectives of grain iron and zinc enrichment in cereals. *Front Plant Sci* 9:937. <https://doi.org/10.3389/fpls.2018.00937>
- Garnica M, Bacaicoa E, Mora V, et al (2018) Shoot iron status and auxin are involved in iron deficiency-induced phytosiderophores release in wheat. *BMC Plant Biol* 18:105. <https://doi.org/10.1186/s12870-018-1324-3>
- Ghosh UD, Saha C, Maiti M, et al (2014) Root associated iron oxidizing bacteria increase phosphate nutrition and influence root to shoot partitioning of iron in tolerant plant *Typha angustifolia*. *Plant Soil* 381:279–295. <https://doi.org/10.1007/s11104-014-2085-x>
- Gildersleeve RR, Ocumpaugh WR (1989) Greenhouse evaluation of subterranean clover species for susceptibility to iron-deficiency chlorosis. *Crop science* 29:949–951
- Glasauer S, Weidler PG, Langley S, Beveridge TJ (2003) Controls on Fe reduction and mineral formation by a subsurface bacterium. *Geochimica et Cosmochimica Acta* 67:1277–1288. [https://doi.org/10.1016/S0016-7037\(02\)01199-7](https://doi.org/10.1016/S0016-7037(02)01199-7)
- Gnonlonfin GJB, Sanni A, Brimer L (2012) Review scopoletin – a coumarin phytoalexin with medicinal properties. *Crit Rev in Plant Sci* 31:47–56. <https://doi.org/10.1080/07352689.2011.616039>
- Gómez-Galera S, Rojas E, Sudhakar D, et al (2010) Critical evaluation of strategies for mineral fortification of staple food crops. *Transgenic Res* 19:165–180. <https://doi.org/10.1007/s11248-009-9311-y>
- Gopal M, Gupta A (2016) Microbiome selection could Spur next-generation plant breeding strategies. *Front Microbiol* 7:1991. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.01971>

- Gregory PJ, Wahbi A, Adu-Gyamfi J, et al (2017) Approaches to reduce zinc and iron deficits in food systems. *Glob Food Sec* 15:1–10. <https://doi.org/10.1016/j.gfs.2017.03.003>
- Grillet L, Lan P, Li W, et al (2018) IRON MAN is a ubiquitous family of peptides that control iron transport in plants. *Nature Plants* 4:953. <https://doi.org/10.1038/s41477-018-0266-y>
- Grillet L, Mari S, Schmidt W (2014) Iron in seeds – loading pathways and subcellular localization. *Front Plant Sci* 4:535. <https://doi.org/10.3389/fpls.2013.00535>
- Grillet L, Schmidt W (2019) Iron acquisition strategies in land plants: not so different after all. *New Phytol* 16005. <https://doi.org/10.1111/nph.16005>
- Hansen NC, Hopkins BG, Ellsworth JW, Jolley VD (2006) Iron nutrition in field crops. In: Barton LL, Abadia J (eds) *Iron nutrition in plants and rhizospheric microorganisms*. Springer Netherlands, Dordrecht, pp 23–59
- Helms TC, Scott RA, Schapaugh WT, et al (2010) Soybean iron-deficiency chlorosis tolerance and yield decrease on calcareous soils. *Agron J* 102:492. <https://doi.org/10.2134/agronj2009.0317>
- Hinsinger P, Plassard C, Tang C, Jaillard B (2003) Origins of root-mediated pH changes in the rhizosphere and their responses to environmental constraints: A review. *Plant Soil* 248:43–59. <https://doi.org/10.1023/A:1022371130939>
- Hirayama T, Lei GJ, Yamaji N, et al (2018) The putative peptide gene FEP1 regulates iron deficiency response in *Arabidopsis*. *Plant Cell Physiol* 59:1739–1752. <https://doi.org/10.1093/pcp/pcy145>
- Höfte M, Bakker PAHM (2007) Competition for iron and induced systemic resistance by siderophores of plant growth promoting rhizobacteria. In: Varma A, Chincholkar SB (eds) *Microbial Siderophores*. Springer, Berlin, Heidelberg, pp 121–133
- Horchani F, Prévot M, Boscari A, et al (2011) Both plant and bacterial nitrate reductases contribute to nitric oxide production in *Medicago truncatula* nitrogen-fixing nodules. *Plant Physiol* 155:1023–1036. <https://doi.org/10.1104/pp.110.166140>
- Hördt W, Römheld V, Winkelmann G (2000) Fusarinines and dimerum acid, mono- and dihydroxamate siderophores from *Penicillium chrysogenum*, improve iron utilization by strategy I and strategy II plants. *Biometals* 13:10
- Ishimaru Y, Kakei Y, Shimo H, et al (2011) A rice phenolic efflux transporter is essential for solubilizing precipitated apoplasmic iron in the plant stele. *J Biol Chem* 286:24649–24655. <https://doi.org/10.1074/jbc.M111.221168>
- Ishimaru Y, Suzuki M, Tsukamoto T, et al (2006) Rice plants take up iron as an Fe³⁺-phytosiderophore and as Fe²⁺. *Plant J* 45:335–346. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2005.02624.x>
- Jain A, Connolly EL (2013) Mitochondrial iron transport and homeostasis in plants. *Front Plant Sci* 4:348. <https://doi.org/10.3389/fpls.2013.00348>
- Jain A, Singh A, Chaudhary A, et al (2014) Modulation of nutritional and antioxidant potential of seeds and pericarp of pea pods treated with microbial consortium. *Food Res Int* 64:275–282. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2014.06.033>
- Jelali N, Wissal M, Dell’orto M, et al (2010) Changes of metabolic responses to direct and induced Fe deficiency of two *Pisum sativum* cultivars. *Environ Exp Bot* 68:238–246. <https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2009.12.003>
- Jin CW, He YF, Tang CX, et al (2006) Mechanisms of microbially enhanced Fe acquisition in red clover (*Trifolium pratense* L.). *Plant Cell Environ* 29:888–897. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3040.2005.01468.x>
- Jin CW, Li GX, Yu XH, Zheng SJ (2010) Plant Fe status affects the composition of siderophore-secreting microbes in the rhizosphere. *Ann Bot* 105:835–841. <https://doi.org/10.1093/aob/mcq071>
- Jin CW, You GY, He YF, et al (2007) Iron deficiency-induced secretion of phenolics facilitates the reutilization of root apoplasmic iron in red clover. *Plant Physiol* 144:278–285. <https://doi.org/10.1104/pp.107.095794>
- Jones P, Garcia BJ, Furches A, et al (2019) Plant host-associated mechanisms for microbial selection. *Front Plant Sci* 10:862. <https://doi.org/10.3389/fpls.2019.00862>

- Kabir AH, Paltridge NG, Roessner U, Stangoulis JCR (2013) Mechanisms associated with Fe-deficiency tolerance and signaling in shoots of *Pisum sativum*. *Physiol Plant* 147:381–395. <https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.2012.01682.x>
- Kaiser DE, Lamb JA, Bloom PR, Hernandez JA (2014) Comparison of field management strategies for preventing iron deficiency chlorosis in soybean. *Agron J* 106:1963–1974. <https://doi.org/10.2134/agronj13.0296>
- Kawakami Y, Bhullar NK (2018) Molecular processes in iron and zinc homeostasis and their modulation for biofortification in rice. *J Integr Plant Biol* 60:1181–1198. <https://doi.org/10.1111/jipb.12751>
- Khan A, Singh J, Upadhayay VK, et al (2019) Microbial biofortification: a green technology through plant growth promoting microorganisms. In: Shah S, Venkatramanan V, Prasad R (eds) *Sustainable Green Technologies for Environmental Management*. Springer Singapore, Singapore, pp 255–269
- Kobae Y, Tomioka R, Tanoi K, et al (2014) Selective induction of putative iron transporters, *OPT8a* and *OPT8b*, in maize by mycorrhizal colonization. *Soil Sci Plant Nutr* 60:843–847. <https://doi.org/10.1080/00380768.2014.949854>
- Kobayashi T, Nishizawa NK (2012) Iron uptake, translocation, and regulation in higher plants. *Annual Review of Plant Biology* 63:131–152. <https://doi.org/10.1146/annurev-arplant-042811-105522>
- Kobayashi T, Nozoye T, Nishizawa NK (2019) Iron transport and its regulation in plants. *Free Radical Bio Med* 133:11–20. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2018.10.439>
- Kocak K (2014) Evaluation of iron deficiency chlorosis in soybeans (*Glycine max*). ETD collection for University of Nebraska - Lincoln 1–106
- Kong HG, Shin TS, Kim TH, Ryu C-M (2018) Stereoisomers of the bacterial volatile compound 2,3-butanediol differently elicit systemic defense responses of pepper against multiple viruses in the field. *Front Plant Sci* 9:90. <https://doi.org/10.3389/fpls.2018.00090>
- Kraemer SM (2004) Iron oxide dissolution and solubility in the presence of siderophores. *Aquat Sci* 66:3–18. <https://doi.org/10.1007/s00027-003-0690-5>
- Kuiper I, Bloemberg GV, Noreen S, et al (2001) Increased uptake of putrescine in the rhizosphere inhibits competitive root colonization by *Pseudomonas fluorescens* strain WCS365. *Mol Plant Microbe In* 14:1096–1104. <https://doi.org/10.1094/MPMI.2001.14.9.1096>
- Kumar A, Kaur G, Goel P, et al (2019) Genome-wide analysis of oligopeptide transporters and detailed characterization of yellow stripe transporter genes in hexaploid wheat. *Funct Integr Genomics* 19:75–90. <https://doi.org/10.1007/s10142-018-0629-5>
- Labidi S, Ben Jeddi F, Tisserant B, et al (2012) Role of arbuscular mycorrhizal symbiosis in root mineral uptake under CaCO₃ stress. *Mycorrhiza* 22:337–345. <https://doi.org/10.1007/s00572-011-0405-z>
- Lasa AV, Mašíňová T, Baldrian P, Fernández-López M (2019) Bacteria from the endosphere and rhizosphere of *Quercus* spp. use mainly cell wall-associated enzymes to decompose organic matter. *PLoS One* 14:e0214422. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0214422>
- Lassoued R, Smyth SJ, Phillips PWB, Hessel H (2018) Regulatory uncertainty around new breeding techniques. *Front Plant Sci* 9:1291. <https://doi.org/10.3389/fpls.2018.01291>
- Lavana M, Chauhan PS, Chauhan SVS, et al (2006) Induction of plant defense enzymes and phenolics by treatment with plant growth-promoting rhizobacteria *Serratia marcescens* NBRI1213. *Curr Microbiol* 52:363–368. <https://doi.org/10.1007/s00284-005-5578-2>
- Lei GJ, Zhu XF, Wang ZW, et al (2014) Abscisic acid alleviates iron deficiency by promoting root iron reutilization and transport from root to shoot in *Arabidopsis*. *Plant Cell Environ* 37:852–863. <https://doi.org/10.1111/pce.12203>
- Lemanceau P, Barret M, Mazurier S, et al (2017a) Plant communication with associated microbiota in the spermosphere, rhizosphere and phyllosphere. In: *Advances in Botanical Research*. Elsevier, pp 101–133
- Lemanceau P, Bauer P, Kraemer S, Briat J-F (2009) Iron dynamics in the rhizosphere as a case study for analyzing interactions between soils, plants and microbes. *Plant Soil* 321:513–535. <https://doi.org/10.1007/s11104-009-0039-5>

- Lemanceau P, Blouin M, Muller D, Moënne-Loccoz Y (2017b) Let the core microbiota be functional. *Trends Plant Sci* 22:583–595. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2017.04.008>
- Leyval C, Reid CPP (1991) Utilization of microbial siderophores by mycorrhizal and non-mycorrhizal pine roots. *New Phytol* 119:93–98. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.1991.tb01011.x>
- Li G, Xu W, Kronzucker HJ, Shi W (2015) Ethylene is critical to the maintenance of primary root growth and Fe homeostasis under Fe stress in *Arabidopsis*. *J Exp Bot* 66:2041–2054. <https://doi.org/10.1093/jxb/erv005>
- Li Q, Chen J, Wu L, et al (2018) Belowground interactions impact the soil bacterial community, soil fertility, and crop yield in maize/peanut intercropping systems. *International Journal of Molecular Sciences* 19:622. <https://doi.org/10.3390/ijms19020622>
- Li Q, Yang A, Zhang W-H (2016) Efficient acquisition of iron confers greater tolerance to saline-alkaline stress in rice (*Oryza sativa* L.). *J Exp Bot* 67:6431–6444. <https://doi.org/10.1093/jxb/erw407>
- Liu Z, Beskrovnyaya P, Melnyk RA, et al (2018) A genome-wide screen identifies genes in rhizosphere-associated *Pseudomonas* required to evade plant defenses. *mBio* 9:e00433-18. <https://doi.org/10.1128/mBio.00433-18>
- Lockyer S, White A, Buttriss JL (2018) Biofortified crops for tackling micronutrient deficiencies – what impact are these having in developing countries and could they be of relevance within Europe? *Nutr Bull* 43:319–357. <https://doi.org/10.1111/nbu.12347>
- Longnecker N, Welch RM (1990) Accumulation of apoplastic iron in plant roots: A factor in the resistance of soybeans to iron-deficiency induced chlorosis? *Plant Physiol* 92:17–22. <https://doi.org/10.1104/pp.92.1.17>
- Mahmoudi H, Koyro H-W, Debez A, Abdelly C (2009) Comparison of two chickpea varieties regarding their responses to direct and induced Fe deficiency. *Environ Exp Bot* 66:349–356. <https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2009.03.013>
- Malhotra H, Pandey R, Sharma S, Bindraban PS (2019) Foliar fertilization: possible routes of iron transport from leaf surface to cell organelles. *Arch Agron Soil Sci* 1–22. <https://doi.org/10.1080/03650340.2019.1616288>
- Manthey JA, Tisserat B, Crowley DE (1996) Root responses of sterile-grown onion plants to iron deficiency. *J Plant Nutr* 19:145–161. <https://doi.org/10.1080/01904169609365113>
- Manwaring HR, Bligh HFJ, Yadav R (2016) The challenges and opportunities associated with biofortification of pearl millet (*Pennisetum glaucum*) with elevated levels of grain iron and zinc. *Front Plant Sci* 7:1944. <https://doi.org/10.3389/fpls.2016.01944>
- Marschner P, Crowley D, Rengel Z (2011) Rhizosphere interactions between microorganisms and plants govern iron and phosphorus acquisition along the root axis – model and research methods. *Soil Biol Biochem* 43:883–894. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2011.01.005>
- Mary V, Ramos MS, Gillet C, et al (2015) Bypassing iron storage in endodermal vacuoles rescues the iron mobilization defect in the natural resistance associated-macrophage protein3natural resistance associated-macrophage protein4 Double Mutant. *Plant Physiol* 169:748–759. <https://doi.org/10.1104/pp.15.00380>
- Masalha J, Kosegarten H, Elmaci Ö, Mengel K (2000) The central role of microbial activity for iron acquisition in maize and sunflower. *Biol Fertil Soils* 30:433–439. <https://doi.org/10.1007/s003740050021>
- Mehnaz S (2016) An Overview of Globally Available Bioformulations. In: Arora NK, Mehnaz S, Balestrini R (eds) *Bioformulations: for Sustainable Agriculture*. Springer India, New Delhi, pp 267–281
- Michel L, Beyá-Marshall V, Rombolà AD, et al (2019) Evaluation of FE-heme applications or intercropping for preventing iron deficiency in blueberry. *J Soil Sci Plant Nutr* 19:117–126. <https://doi.org/10.1007/s42729-019-0017-9>

- Mishra PK, Bisht SC, Ruwari P, et al (2011) Bioassociative effect of cold tolerant *Pseudomonas* spp. and *Rhizobium leguminosarum*-PR1 on iron acquisition, nutrient uptake and growth of lentil (*Lens culinaris* L.). *Eur J Soil Biol* 47:35–43. <https://doi.org/10.1016/j.ejsobi.2010.11.005>
- Morrissey J, Baxter IR, Lee J, et al (2009) The ferroportin metal efflux proteins function in iron and cobalt homeostasis in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 21:3326–3338. <https://doi.org/10.1105/tpc.109.069401>
- Murgia I, Arosio P, Tarantino D, Soave C (2012) Biofortification for combating ‘hidden hunger’ for iron. *Trends Plant Sci* 17:47–55. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2011.10.003>
- Nagata T (2017) Effect of *Pseudomonas fluorescens* inoculation on the improvement of iron deficiency in tomato. *Plant Root* 11:1–9. <https://doi.org/10.3117/plantroot.11.1>
- Nagata T, Oobo T, Aozasa O (2013) Efficacy of a bacterial siderophore, pyoverdine, to supply iron to *Solanum lycopersicum* plants. *J Biosci Bioengi* 115:686–690. <https://doi.org/10.1016/j.jbiosc.2012.12.018>
- Nevo Y, Nelson N (2006) The NRAMP family of metal-ion transporters. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research* 1763:609–620. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2006.05.007>
- Norton J, Ouyang Y (2019) Controls and adaptive management of nitrification in agricultural soils. *Front Microbiol* 10:1931. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.01931>
- Orera I, Abadía A, Abadía J, Álvarez-Fernández A (2009) Determination of o,oEDDHA – a xenobiotic chelating agent used in Fe fertilizers – in plant tissues by liquid chromatography/electrospray mass spectrometry: overcoming matrix effects. *Rapid Commun Mass Sp* 23:1694–1702. <https://doi.org/10.1002/rcm.4056>
- Orera I, Rodríguez-Castrillón J, Moldovan M, et al (2010) Using a dual-stable isotope tracer method to study the uptake, xylem transport and distribution of Fe and its chelating agent from stereoisomers of an Fe(III)-chelate used as fertilizer in Fe-deficient Strategy I plants. *Metallomics* 2:646–657. <https://doi.org/10.1039/C0MT00018C>
- Palmer CM, Hindt MN, Schmidt H, et al (2013) MYB10 and MYB72 are required for growth under iron-limiting conditions. *PLoS Genet* 9:e1003953. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1003953>
- Pedas P, Ytting CK, Fuglsang AT, et al (2008) Manganese efficiency in barley: identification and characterization of the metal ion transporter HvIRT1. *Plant Physiol* 148:455–466. <https://doi.org/10.1104/pp.108.118851>
- Pieterse CMJ, Zamioudis C, Berendsen RL, et al (2014) Induced systemic resistance by beneficial microbes. *Annu Rev Phytopathol* 52:347–375. <https://doi.org/10.1146/annurev-phyto-082712-102340>
- Pourbabaee AA, Shoaibi F, Emami S, Alikhani HA (2018) The potential contribution of siderophore producing bacteria on growth and Fe ion concentration of sunflower (*Helianthus annuus* L.) under water stress. *J Plant Nutr* 41:619–626. <https://doi.org/10.1080/01904167.2017.1406112>
- Radzki W, Gutierrez Mañero FJ, Algar E, et al (2013) Bacterial siderophores efficiently provide iron to iron-starved tomato plants in hydroponics culture. *Antonie van Leeuwenhoek* 104:321–330. <https://doi.org/10.1007/s10482-013-9954-9>
- Rajkumar M, Ae N, Prasad MNV, Freitas H (2010) Potential of siderophore-producing bacteria for improving heavy metal phytoextraction. *Trends Biotechnol* 28:142–149. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2009.12.002>
- Ravanbakhsh M, Sasidharan R, Voesenek LACJ, et al (2018) Microbial modulation of plant ethylene signaling: ecological and evolutionary consequences. *Microbiome* 6:52. <https://doi.org/10.1186/s40168-018-0436-1>
- Rellán-Álvarez R, Andaluz S, Rodríguez-Celma J, et al (2010) Changes in the proteomic and metabolic profiles of *Beta vulgaris* root tips in response to iron deficiency and resupply. *BMC Plant Biology* 10:120. <https://doi.org/10.1186/1471-2229-10-120>
- Reza M, (2017) Assessing the effect of siderophore producing bacteria for the iron nutrition in lentil and pea. Ph. D. Thesis, University of Saskatchewan
- Rijavec T, Lapanje A (2016) Hydrogen cyanide in the rhizosphere: not suppressing plant pathogens, but rather regulating availability of phosphate. *Front Microbiol* 7:1785. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.01785>

- Robin A, Mazurier S, Mougel C, et al (2007) Diversity of root-associated fluorescent pseudomonads as affected by ferritin overexpression in tobacco: diversity of fluorescent pseudomonads in rhizosphere. *Environ Microbiol* 9:1724–1737. <https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2007.01290.x>
- Robin A, Mougel C, Siblot S, et al (2006) Effect of ferritin overexpression in tobacco on the structure of bacterial and pseudomonad communities associated with the roots: Structure of rhizosphere bacterial and pseudomonad communities. *FEMS Microbiol Ecol* 58:492–502. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6941.2006.00174.x>
- Robin A, Vansuyt G, Hinsinger P, et al (2008) Chapter 4 Iron dynamics in the rhizosphere. In: *Advances in Agronomy*. Elsevier, pp 183–225
- Rodriguez PA, Rothballer M, Chowdhury SP, et al (2019) Systems biology of plant-microbiome interactions. *Molecular Plant* 12:804–821. <https://doi.org/10.1016/j.molp.2019.05.006>
- Rodríguez-Celma J, Pan IC, Li W, et al (2013) The transcriptional response of *Arabidopsis* leaves to Fe deficiency. *Front Plant Sci* 4:276. <https://doi.org/10.3389/fpls.2013.00276>
- Romera FJ, García MJ, Lucena C, et al (2019) Induced systemic resistance (ISR) and Fe deficiency responses in dicot plants. *Front Plant Sci* 10:287. <https://doi.org/10.3389/fpls.2019.00287>
- Roschztardt H, Conéjéro G, Curie C, Mari S (2009) Identification of the endodermal vacuole as the iron storage compartment in the *Arabidopsis* Embryo. *Plant Physiol* 151:1329–1338. <https://doi.org/10.1104/pp.109.144444>
- Rroço E, Kosegarten H, Harizaj F, et al (2003) The importance of soil microbial activity for the supply of iron to sorghum and rape. *Eur J Agron* 19:487–493. [https://doi.org/10.1016/S1161-0301\(02\)00185-5](https://doi.org/10.1016/S1161-0301(02)00185-5)
- Saha M, Sarkar S, Sarkar B, et al (2016) Microbial siderophores and their potential applications: a review. *Environ Sci Pollut Res* 23:3984–3999. <https://doi.org/10.1007/s11356-015-4294-0>
- Sandberg A-S (2002) Bioavailability of minerals in legumes. *Br J Nutr* 88:281–285. <https://doi.org/10.1079/BJN/2002718>
- Santos CS, Roriz M, Carvalho SMP, Vasconcelos MW (2015) Iron partitioning at an early growth stage impacts iron deficiency responses in soybean plants (*Glycine max* L.). *Front Plant Sci* 6:325. <https://doi.org/10.3389/fpls.2015.00325>
- Schmid NB, Giehl RFH, Döll S, et al (2014) Feruloyl-CoA 6'-Hydroxylase1-dependent coumarins mediate iron acquisition from alkaline substrates in *Arabidopsis*. *Plant Physiol* 164:160–172. <https://doi.org/10.1104/pp.113.228544>
- Schmidt H, Günther C, Weber M, et al (2014) Metabolome analysis of *Arabidopsis thaliana* roots identifies a key ketabolic pathway for iron acquisition. *PLoS ONE* 9:e102444. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0102444>
- Sessitsch A, Hardoim P, Döring J, et al (2012) Functional characteristics of an endophyte community colonizing rice roots as revealed by metagenomic analysis. *Mol Plant Microbe In* 25:28–36. <https://doi.org/10.1094/MPMI-08-11-0204>
- Sharma A, Shankhdhar D, Shankhdhar SC (2013a) Enhancing grain iron content of rice by the application of plant growth promoting rhizobacteria. *Plant Soil Environ* 59:89–94. <https://doi.org/10.17221/683/2012-PSE>
- Sharma SB, Sayyed RZ, Trivedi MH, Gobi TA (2013b) Phosphate solubilizing microbes: sustainable approach for managing phosphorus deficiency in agricultural soils. *SpringerPlus* 2:587. <https://doi.org/10.1186/2193-1801-2-587>
- Shenker M, Chen Y, Ghirlando R, et al (1995) Chemical structure and biological activity of a siderophore produced by *Rhizopus arrhizus*. *Soil Sci Soc Am J* 59:837. <https://doi.org/10.2136/sssaj1995.03615995005900030029x>
- Shi R, Melzer M, Zheng S, et al (2018) Iron retention in root hemicelluloses causes genotypic variability in the tolerance to iron deficiency-induced chlorosis in maize. *Front Plant Sci* 9:557. <https://doi.org/10.3389/fpls.2018.00557>

- Shirley M, Avoscan L, Bernaud E, et al (2011) Comparison of iron acquisition from Fe–pyoverdine by strategy I and strategy II plants. *Botany* 89:731–735. <https://doi.org/10.1139/b11-054>
- Shomer I, Novacky AJ, Pike SM, et al (2003) Electrical potentials of plant cell walls in response to the ionic environment. *Plant Physiol* 133:411–422. <https://doi.org/10.1104/pp.103.024539>
- Singh A, Jain A, Sarma BK, et al (2014) Rhizosphere competent microbial consortium mediates rapid changes in phenolic profiles in chickpea during *Sclerotium rolfsii* infection. *Microbiol Res* 169:353–360. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2013.09.014>
- Singh D, Geat N, Rajawat MVS, et al (2018) Prospecting endophytes from different Fe or Zn accumulating wheat genotypes for their influence as inoculants on plant growth, yield, and micronutrient content. *Ann Microbiol* 68:815–833. <https://doi.org/10.1007/s13213-018-1388-1>
- Singh D, Geat N, Rajawat MVS, et al (2017) Deciphering the mechanisms of endophyte-mediated biofortification of Fe and Zn in wheat. *J Plant Growth Regul* 37:174–182. <https://doi.org/10.1007/s00344-017-9716-4>
- Sisó-Terraza P, Luis-Villarroya A, Fourcroy P, et al (2016) Accumulation and secretion of coumarinolignans and other coumarins in *Arabidopsis thaliana* roots in response to iron deficiency at high pH. *Front Plant Sci* 7:1711. <https://doi.org/10.3389/fpls.2016.01711>
- Slamet-Loedin IH, Johnson-Beebout SE, Impa S, Tsakirpaloglou N (2015) Enriching rice with Zn and Fe while minimizing Cd risk. *Front Plant Sci* 6:121. <https://doi.org/10.3389/fpls.2015.00121>
- Smith SE, Jakobsen I, Grønlund M, Smith FA (2011) Roles of arbuscular mycorrhizas in plant phosphorus nutrition: interactions between pathways of phosphorus uptake in arbuscular mycorrhizal roots have important implications for understanding and manipulating plant phosphorus acquisition. *Plant Physiol* 156:1050–1057. <https://doi.org/10.1104/pp.111.174581>
- Song C, Mazzola M, Cheng X, et al (2015) Molecular and chemical dialogues in bacteria-protozoa interactions. *Sci Rep* 5:12837. <https://doi.org/10.1038/srep12837>
- Stringlis IA, Yu K, Feussner K, et al (2018) MYB72-dependent coumarin exudation shapes root microbiome assembly to promote plant health. *Proc Natl Acad Sci USA* 115:E5213–E5222. <https://doi.org/10.1073/pnas.1722335115>
- Su H, Chu Y, Bai J, et al (2018) Genome-wide identification and comparative analysis for OPT Family genes in *Panax ginseng* and Eleven Flowering Plants. *Molecules* 24:15. <https://doi.org/10.3390/molecules24010015>
- Sullivan TS, Gadd GM (2019) Metal bioavailability and the soil microbiome. In: *Advances in Agronomy*. Academic Press, pp 79–120
- Taschen E, Amenc L, Tournier E, et al (2017) Cereal-legume intercropping modifies the dynamics of the active rhizospheric bacterial community. *Rhizosphere* 3:191–195. <https://doi.org/10.1016/j.rhisph.2017.04.011>
- Theis KR, Dheilly NM, Klassen JL, et al (2016) Getting the hologenome concept right: an eco-evolutionary framework for hosts and their microbiomes. *mSystems* 1:pil: e00028-16. <https://doi.org/10.1128/mSystems.00028-16>
- Trapet P, Avoscan L, Klinguer A, et al (2016) The *Pseudomonas fluorescens* siderophore pyoverdine weakens *Arabidopsis thaliana* defense in favor of growth in iron-deficient conditions. *Plant Physiol* 171:675–693. <https://doi.org/10.1104/pp.15.01537>
- Tsai H-H, Schmidt W (2017) One way. Or another? Iron uptake in plants. *New Phytol* 214:500–505. <https://doi.org/10.1111/nph.14477>
- Turner TR, Ramakrishnan K, Walshaw J, et al (2013) Comparative metatranscriptomics reveals kingdom level changes in the rhizosphere microbiome of plants. *Int Soc Microbial Ecol J* 7:2248–2258. <https://doi.org/10.1038/ismej.2013.119>
- UNDP (2015) Sustainable Development Goals. In: United nations development programme. <https://www.undp.org/content/undp/en/home/sustainable-development-goals.html>. Accessed 4 Nov 2019

- van Loon LC, Bakker PA, van der Heijdt WH, et al (2008) Early responses of tobacco suspension cells to rhizobacterial elicitors of induced systemic resistance. *Mol Plant Microbe In* 21:1609–1621. <https://doi.org/doi.org/10.1094/MPMI-21-12-1609>
- Vandenkoornhuysse P, Quaiser A, Duhamel M, et al (2015) The importance of the microbiome of the plant holobiont. *New Phytol* 206:1196–1206. <https://doi.org/10.1111/nph.13312>
- Vansuyt G, Robin A, Briat J-F, et al (2007) Iron acquisition from Fe-pyoverdine by *Arabidopsis thaliana*. *Mol Plant Microbe In* 20:441–447. <https://doi.org/doi.org/10.1094/MPMI-20-4-0441>
- Vansuyt G, Souche G, Straczek A, et al (2003) Flux of protons released by wild type and ferritin over-expressor tobacco plants: effect of phosphorus and iron nutrition. *Plant Physiol Biochem* 41:27–33. [https://doi.org/10.1016/S0981-9428\(02\)00005-0](https://doi.org/10.1016/S0981-9428(02)00005-0)
- Vasconcelos M, Eckert H, Arahana V, et al (2006) Molecular and phenotypic characterization of transgenic soybean expressing the *Arabidopsis* ferric chelate reductase gene, *FRO2*. *Planta* 224:1116–1128. <https://doi.org/10.1007/s00425-006-0293-1>
- Vert G, Barberon M, Zelazny E, et al (2009) *Arabidopsis* IRT2 cooperates with the high-affinity iron uptake system to maintain iron homeostasis in root epidermal cells. *Planta* 229:1171–1179. <https://doi.org/10.1007/s00425-009-0904-8>
- Wakeel A, Farooq M, Bashir K, Ozturk L (2018) Micronutrient malnutrition and biofortification: recent advances and future perspectives. In: *Plant micronutrient use efficiency*. Elsevier, pp 225–243
- Wang J, Zhou C, Xiao X, et al (2017) Enhanced iron and selenium uptake in plants by volatile emissions of *Bacillus amyloliquefaciens* (BF06). *Appl Sci* 7:85. <https://doi.org/10.3390/app7010085>
- Wang Y, Brown HN, Crowley DE, Szanislo PJ (1993) Evidence for direct utilization of a siderophore, ferrioxamine B, in axenically grown cucumber. *Plant Cell Environ* 16:579–585. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3040.1993.tb00906.x>
- Waters BM, Amundsen K, Graef G (2018) Gene expression profiling of iron deficiency chlorosis sensitive and tolerant soybean indicates key roles for phenylpropanoids under alkalinity stress. *Front Plant Sci* 9:10. <https://doi.org/10.3389/fpls.2018.00010>
- Waters BM, Sankaran RP (2011) Moving micronutrients from the soil to the seeds: genes and physiological processes from a biofortification perspective. *Plant Science* 180:562–574. <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2010.12.003>
- Wei Z, Jousset A (2017) Plant breeding goes microbial. *Trends Plant Sci* 22:555–558. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2017.05.009>
- Welch RM, House WA, Beebe S, Cheng Z (2000) Genetic selection for enhanced bioavailable levels of iron in bean (*Phaseolus vulgaris* L.) seeds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 48:3576–3580. <https://doi.org/10.1021/jf0000981>
- Werra P de, Péchy-Tarr M, Keel C, Maurhofer M (2009) Role of gluconic acid production in the regulation of biocontrol traits of *Pseudomonas fluorescens* CHA0. *Appl Environ Microbiol* 75:4162–4174. <https://doi.org/10.1128/AEM.00295-09>
- White P, Broadley M (2005) Biofortifying crops with essential mineral elements. *Trends Plant Sci* 10:586–593. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2005.10.001>
- White PJ, Broadley MR (2009) Biofortification of crops with seven mineral elements often lacking in human diets - iron, zinc, copper, calcium, magnesium, selenium and iodine: Research review. *New Phytol* 182:49–84. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2008.02738.x>
- Wille L, Messmer MM, Studer B, Hohmann P (2019) Insights to plant–microbe interactions provide opportunities to improve resistance breeding against root diseases in grain legumes. *Plant Cell Environ* 42:20–40. <https://doi.org/10.1111/pce.13214>
- Winterbourn CC (1995) Toxicity of iron and hydrogen peroxide: the Fenton reaction. *Toxicology Letters* 82–83:969–974. [https://doi.org/10.1016/0378-4274\(95\)03532-X](https://doi.org/10.1016/0378-4274(95)03532-X)

- World Health Organization (2017) Nutritional anaemias: tools for effective prevention and control. In: Nutritional anaemias: tools for effective prevention and control. Geneva
- World Health Organization W (2018) Global nutrition policy review 2016-2017: country progress in creating enabling policy environments for promoting healthy diets and nutrition. Geneva
- Xiong H, Kakei Y, Kobayashi T, et al (2013) Molecular evidence for phytosiderophore-induced improvement of iron nutrition of peanut intercropped with maize in calcareous soil. *Plant Cell Environ* 36:1888–1902. <https://doi.org/10.1111/pce.12097>
- Xue P-P, Carrillo Y, Pino V, et al (2018) Soil properties drive microbial community structure in a large scale transect in South Eastern Australia. *Sci Rep* 8:1–11. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-30005-8>
- Xue Y, Xia H, Christie P, et al (2016) Crop acquisition of phosphorus, iron and zinc from soil in cereal/legume intercropping systems: a critical review. *Ann Bot* 117:363–377. <https://doi.org/10.1093/aob/mcv182>
- Yehuda Z, Shenker M, Hadar Y, Chen Y (2000) Remedy of chlorosis induced by iron deficiency in plants with the fungal siderophore rhizoferrin. *J Plant Nutr* 23:1991–2006. <https://doi.org/10.1080/01904160009382160>
- Yuan J, Chen Y, Li H, et al (2018) New insights into the cellular responses to iron nanoparticles in *Capsicum annuum*. *Sci Rep* 8:3228. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-18055-w>
- Zaeem M, Nadeem M, Pham TH, et al (2019) The potential of corn-soybean intercropping to improve the soil health status and biomass production in cool climate boreal ecosystems. *Sci Rep* 9:1–17. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-49558-3>
- Zamioudis C, Hanson J, Pieterse CMJ (2014) β -Glucosidase BGLU42 is a MYB72-dependent key regulator of rhizobacteria-induced systemic resistance and modulates iron deficiency responses in *Arabidopsis* roots. *New Phytol* 204:368–379. <https://doi.org/10.1111/nph.12980>
- Zanin L, Tomasi N, Cesco S, et al (2019) Humic substances contribute to plant iron nutrition acting as chelators and biostimulants. *Front Plant Sci* 10:675. <https://doi.org/10.3389/fpls.2019.00675>
- Zhang H, Sun Y, Xie X, et al (2009) A soil bacterium regulates plant acquisition of iron via deficiency-inducible mechanisms. *Plant J* 58:568–577. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2009.03803.x>
- Zhang L, Xing J, Lin J (2019) At the intersection of exocytosis and endocytosis in plants. *New Phytol* 224:1479–1489. <https://doi.org/10.1111/nph.16018>
- Zhang Y, Xu Y-H, Yi H-Y, Gong J-M (2012) Vacuolar membrane transporters OsVIT1 and OsVIT2 modulate iron translocation between flag leaves and seeds in rice. *Plant J* 72:400–410. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2012.05088.x>
- Zhou C, Guo J, Zhu L, et al (2016) *Paenibacillus polymyxa* BFKC01 enhances plant iron absorption via improved root systems and activated iron acquisition mechanisms. *Plant Physiol Biochem* 105:162–173. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2016.04.025>
- Zhou C, Zhu L, Ma Z, Wang J (2018) Improved iron acquisition of *Astragalus sinicus* under low iron-availability conditions by soil-borne bacteria *Burkholderia cepacia*. *Journal of Plant Interactions* 13:9–20. <https://doi.org/10.1080/17429145.2017.1407000>
- Zhu XF, Wang B, Song WF, et al (2016) Putrescine alleviates iron deficiency via NO-dependent reutilization of root cell-wall Fe in *Arabidopsis*. *Plant Physiol* 170:558–567. <https://doi.org/10.1104/pp.15.01617>
- Zielińska-Dawidziak M (2015) Plant ferritin—a source of iron to prevent its deficiency. *Nutrients* 7:1184–1201. <https://doi.org/10.3390/nu7021184>
- Zribi K, Gharsalli M (2002) Effect of bicarbonate on growth and iron nutrition of pea. *J Plant Nutr* 25:2143–2149. <https://doi.org/10.1081/PLN-120014066>
- Zuo Y, Zhang F (2009) Iron and zinc biofortification strategies in dicot plants by intercropping with gramineous species. A review. *Agron Sustain Dev* 29:63–71. <https://doi.org/10.1051/agro:2008055>
- Zuo Y, Zhang F (2011) Soil and crop management strategies to prevent iron deficiency in crops. *Plant Soil* 339:83–95. <https://doi.org/10.1007/s11104-010-0566-0>

Bilan

Les mécanismes par lesquels les microorganismes influencent le statut en fer des plantes ont été présentés dans cette revue, mais aussi des hypothèses relatives à des mécanismes d'interaction potentiels identifiés dans la littérature et qui restent à étudier. En plus de leurs effets sur la biodisponibilité et sur l'acquisition du fer par les plantes, l'impact des microorganismes sur la répartition du fer dans les plantes et les graines, et sur les formes de fer et leur assimilabilité ont été illustrés. Les microorganismes influencent aussi des mécanismes tels que la synthèse racinaire de composés phénoliques et la remobilisation associée du fer de l'apoplaste. Ces mécanismes, qui ont été identifiés comme impliqués dans la tolérance à l'IDC, sont présentés comme de nouvelles cibles prometteuses pour l'amélioration végétale. Ces différents éléments soulignent l'intérêt de prendre en compte la composante microbienne dans les processus d'amélioration du statut en fer des plantes.

Plus globalement, l'ensemble des travaux rapportés montre que les interactions entre la plante, son microbiote et l'environnement impactent la dynamique du fer en lien avec la santé et la croissance de la plante. Ces interactions complexes et interdépendantes incitent à réfléchir à de nouvelles voies d'amélioration intégratives. Il pourrait être intéressant de ne plus diriger l'amélioration végétale vers la sélection de résistances ou de capacités particulières mais, plus globalement, vers la recherche de plantes capables d'optimiser les interactions biotiques leur permettant de s'adapter rapidement à la survenue de stress biotiques ou abiotiques dans un environnement donné.

Ce travail bibliographique a également souligné l'importance des *Pseudomonas* et des sidérophores dans les interactions impactant le statut en fer des plantes. Une part importante des travaux rapportés concernait des *Pseudomonas* et leurs effets bénéfiques pour la plante. De même, les sidérophores sont apparus particulièrement intéressants car impliqués dans différents mécanismes d'interaction avec la plante. Ces éléments ont conforté notre intention de nous intéresser plus particulièrement aux *Pseudomonas* et à leurs sidérophores dans ce travail ciblant les effets des microorganismes sur la nutrition en fer, la croissance et l'immunité du pois.

Chapitre II : Impact du génotype de pois sur les communautés bactériennes, les *Pseudomonas* spp. fluorescents et les pyoverdines associées

***Manuscrit destiné à être soumis en version anglaise à
« Frontiers in microbiology »***

Une partie des résultats (diversité des communautés de *Pseudomonas*) reste encore à être analysée avant la soumission en anglais

Avant-propos

L'objectif principal de cette étude a été d'étudier l'impact de la plante sur le microbiote de la rhizosphère.

Pour étudier l'impact du génotype de pois sur les microorganismes, la stratégie a été de sélectionner deux cultivars de pois, l'un sensible (S), et l'autre tolérant (T), à la chlorose ferrique afin de pouvoir dégager des hypothèses de la comparaison des données acquises. Cette sélection a été faite en collaboration avec un semencier (P. Declerck, RAGT 2n) et des écophysiologistes (C. Jeudy et C. Salon) travaillant sur le pois au sein du pôle GEAPSI (déterminismes Génétiques et Environnementaux de l'Adaptation des Plantes à des Systèmes de culture Innovants) de l'UMR Agroécologie. Des résultats d'essais réalisés au champ et en serre dans le cadre d'un projet RAGT-INRA (PersPEAcase RAGT-INRA) ont été confrontés pour arrêter un choix sur deux cultivars de pois fourragés d'hiver.

Pour décrire la diversité des *Pseudomonas* et des pyoverdines qu'ils synthétisent il a été nécessaire de développer des méthodes de caractérisation moléculaires. En effet, les séquences partielles d'ARNr 16S utilisées généralement comme marqueurs taxonomiques pour les bactéries ne permettent pas d'obtenir une bonne description de la diversité infra-générique pour les *Pseudomonas*. De plus, un des objectifs est d'étudier la diversité taxonomique des communautés de *Pseudomonas* directement à partir d'ADN extrait de la rhizosphère et de pouvoir évaluer la diversité des pyoverdines qu'ils synthétisent. Des gènes marqueurs de la diversité taxonomique et fonctionnelle (pyoverdines) des *Pseudomonas* ont donc été recherchés.

Trois gènes ont été sélectionnés. L'un des gènes choisis code un régulateur transcriptionnel global *gacA*. Deux autres gènes ont été choisis, *pvdA* et *pvdQ*, en raison de leur implication directe dans la synthèse des pyoverdines.

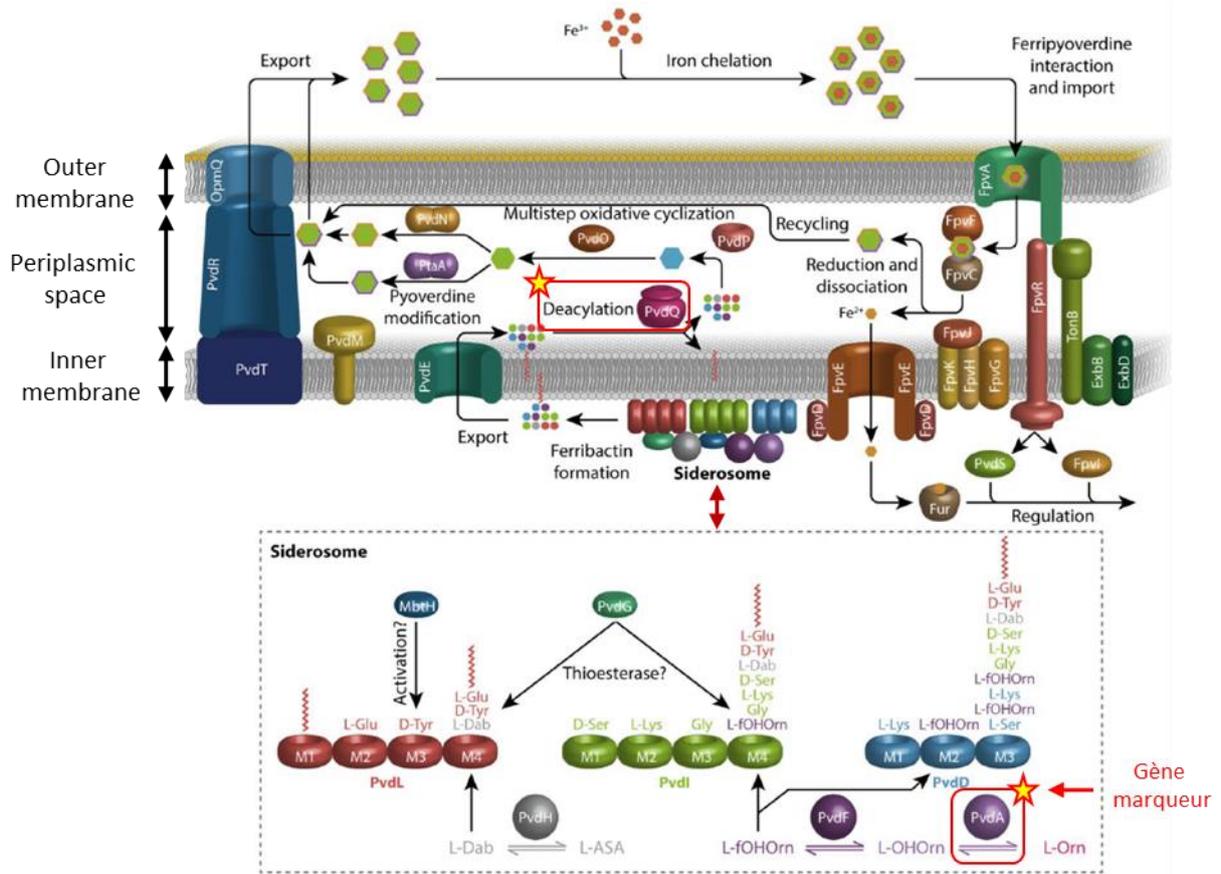


Figure 1. Schéma de la biosynthèse, la sécrétion, l'acquisition et le recyclage de la pyoverdine chez *P. fluorescens* A506 (Extrait de Ringel et Brüser, 2018).

La synthèse des pyoverdines résulte d'un ensemble de mécanismes de synthèse et de régulations complexes codés par de nombreux gènes répartis dans le génome des *Pseudomonas*. Différentes revues ont fait la synthèse des connaissances disponibles sur le sujet (Ravel and Cornelis, 2003; Visca et al., 2007; Ringel and Brüser, 2018). Brièvement, la biosynthèse de la pyoverdine est réalisée en plusieurs étapes clés. Le précurseur de la pyoverdine, la ferribactine, est synthétisé dans le cytoplasme de la bactérie. Cette étape est assurée par des NRPS (Non-Ribosomal Peptides Synthetase) et d'autres enzymes auxiliaires constituant un complexe appelé « sidérosome ». Les NRPS sont des enzymes permettant d'assembler les acides aminés rares de la chaîne peptidique de la pyoverdine. Dans ce sidérosome, certaines protéines sont synthétisées par les gènes *pvdL*, *pvdH*, *pvdI*, *pvdD*, *pvdF*, et ***pvdA*** (**Figure 1**). Le gène ***pvdA*** code pour une oxygenase N5-L-ornithine, qui catalyse l'hydroxylation de la L-ornithine lors des premières étapes de la biosynthèse de la chaîne peptidique de la pyoverdine (Visca et al., 1994; Ge and Seah, 2006). Toutes les souches de *Pseudomonas* n'ont pas le même sidérosome, certains gènes peuvent être absents dans le processus de synthèse de la ferribactine. Une fois synthétisée, la ferribactine est exportée par un transporteur ABC, PvdE, dans le périplasme de la bactérie. Dans ce compartiment, la ferribactine est déacylée par PvdQ (**Figure 1 chapitre II**). Le gène ***pvdQ*** code pour une acylase périplasmique, une hydrolase nucléophile N-terminal éliminant le groupement acyle de la ferribactine une fois dans le périplasme (Clevenger et al., 2017; Ringel et al., 2017). Par la suite, la molécule va subir un processus de maturation via PvdP et PvdO modifiant sa conformation en cyclisant la ferribactine pour former le chromophore caractéristique de la pyoverdine. En fonction de la présence ou non de 2 gènes codant pour des transaminases spécifiques dans le génome, *ptA* et *pvdN*, la molécule serait ensuite modifiée soit par PtA (formation d'un résidu α -ketoglutarate) et/ou soit par la protéine PvdN (formation d'un résidu de succinamide). Par conséquent, certaines souches peuvent produire 2 types de pyoverdines et d'autre 1 seul type de pyoverdine. Une fois dans sa conformation finale, la pyoverdine est exportée dans le milieu

extracellulaire par des systèmes de transporteurs comme PvdRT-OpmQ. Un autre système transporteur des pyoverdines non connu semble aussi jouer un rôle. Il a en effet été montré que la mutation du système pvdRT-opmQ ne réduit que de 50-60% l'export de pyoverdine dans le milieu extracellulaire (Imperi *et al.*, 2009).

L'intérêt en tant que marqueur taxonomique et/ou fonctionnel a été évalué pour chacun des 3 gènes sélectionnés en étudiant leur polymorphisme au sein d'une importante collection de souches de référence à partir d'amplifications par PCR. La structure des pyoverdines correspondantes était connue pour une partie de ces souches et l'ensemble des pyoverdines a de plus été caractérisé par analyse en focalisation isoélectrique (isoelectrofocusing, IEF) ; travail réalisé par Jean-Paul Lemaitre (Maître de conférences) dans le cadre d'une collaboration au sein de mon équipe d'accueil. Les marqueurs sélectionnés ont été utilisés pour étudier la diversité des *Pseudomonas* associés aux deux génotypes de pois. Pour cela les cultivars de pois S et T ont été cultivés au champ dans un sol carbonaté (Montardoise) en champagne crayeuse. Le fer est très peu disponible dans ce sol de pH 8,27 dans lequel des symptômes d'IDC peuvent apparaître. Au stade de début de floraison (Avril), les racines de plantes de chaque cultivar ont été prélevées afin (i) d'extraire l'ADN microbien total et (ii) isoler les *Pseudomonas* spp. fluorescents associés. En plus de la diversité des *Pseudomonas* isolés des plantes, la diversité des communautés bactériennes totales (ADNr 16S) a été étudiée ; travail réalisé par Barbara Pivato (CR) dans le cadre d'une collaboration au sein de mon équipe d'accueil. Les outils de caractérisation développés ont aussi été utilisés pour étudier les communautés de *Pseudomonas* directement à partir d'ADN extrait des racines. Les résultats du séquençage sont en cours de traitement et seront insérés dans le manuscrit qui sera également réécrit en anglais pour être soumis à « *Frontiers in microbiology* » ou à « *Environmental Microbiology* ».

Diversity of root associated fluorescent pseudomonads as affected by tolerance to iron deficiency chlorosis in pea (*Pisum sativum*)

Tristan Lurthy¹, Jean-Paul Lemaître¹, Barbara Pivato¹, Laure Avoscan¹, Pierre Plassart¹, Catherine Barraud¹, Florence Deau¹, Philippe Lemanceau¹ and Sylvie Mazurier^{1*}

¹ Agroécologie, AgroSup Dijon, INRAE, Univ. Bourgogne, Univ. Bourgogne Franche-Comté, F-21000 Dijon, France

Running title: Root associated pseudomonads vary with pea genotype

E-mail address: tristan.lurthy@inra.fr, jplemait@u-bourgogne.fr; barbara.pivato@inra.fr; laure.avoscan@inra.fr; plassart.p@gmail.com, catherine.barraud@inra.fr; florence.deau@inra.fr; philippe.lemanceau@inra.fr; sylvie.mazurier@inra.fr

Nombre total de tableaux :3

Nombre total de figures : 2

Nombre total de figures : 4

Nombre total de références : 91

Mots clés : *Pseudomonas*; pyoverdine; *Pisum sativum* ; iron; chlorose ferrique;

Correspondance : S. Mazurier, UMR 1347 Agroécologie, 17 rue Sully, BV 86510, F-21065 Dijon cedex, France

E-mail : sylvie.mazurier@inra.fr

1. Introduction

Le fer est un élément essentiel à la physiologie des organismes aérobies et en particulier des plantes. Il joue en effet un rôle central dans des processus physiologiques majeurs qui impliquent des réactions d'oxydo-réduction (Balk and Schaedler, 2014). Le fer est aussi un composant essentiel de la chlorophylle impactant directement l'efficacité de la photosynthèse et donc la productivité végétale (Briat et al., 2015). Cet élément impacte également significativement la productivité des légumineuses qui ont d'importants besoins en fer. Il est nécessaire à la synthèse de protéines indispensables à la fixation biologique de l'azote atmosphérique comme la léghémoglobine et la nitrogénase (Brear et al., 2013). La nutrition en fer du pois est non seulement essentielle pour sa productivité, mais également pour la teneur en fer de ses graines. La richesse en fer des graines de légumineuses, dont le pois, représente un enjeu important dans le cadre du remplacement de protéines animales (apportées par l'alimentation carnée, source majeure de fer) par des protéines végétales. En effet, selon l'OMS, l'anémie ferriprive est le trouble nutritionnel le plus répandu dans le monde (World Health Organization, 2019). La carence en fer, à laquelle le pois est particulièrement sensible, se traduit par un jaunissement des feuilles attestant d'une diminution de leur teneur en chlorophylle. Comme pour beaucoup d'autres légumineuses importantes en agriculture (Soja, trèfle, arachide, pois chiche...), différentes variétés de pois peuvent être plus ou moins tolérantes à la chlorose ferrique ou IDC (Iron Deficiency Chlorosis) (Gildersleeve and Ocumpaugh, 1989; Zribi and Gharsalli, 2002; Mahmoudi et al., 2009; Helms et al., 2010). Cette sensibilité à la carence en fer est problématique car la biodisponibilité du fer est faible dans les sols agricoles du fait de leurs propriétés physico-chimiques (pO₂ et pH) et diminue rapidement avec l'élévation de leur pH (Robin et al., 2008). La culture est ainsi particulièrement affectée par les problèmes d'IDC dans les sols alcalins. La progression des connaissances dans le domaine de la nutrition en fer des plantes est donc primordiale pour faire face aux enjeux agronomiques et de qualité des produits. Cette nutrition repose sur des stratégies actives d'acquisition du fer (Curie and Briat, 2003; Kobayashi and Nishizawa, 2012) consistant principalement (i) chez les dicotylédones, en l'acidification de la rhizosphère, la réduction de Fe³⁺ en Fe²⁺ et son incorporation par des transporteurs spécifiques (Stratégie I) et (ii) chez les graminées, en la synthèse de phytosidérophores chélatant le fer (Fe³⁺), les complexes ferriques étant ensuite incorporés par des transporteurs (Stratégie II). Outre ces

deux stratégies, la sécrétion racinaire de composés phénoliques fluorescents capables de chélater le fer est un autre mécanisme d'acquisition du fer par les plantes qui semble avoir une importance particulière en milieu alcalin (Fourcroy et al., 2014; Schmid et al., 2014; Schmidt et al., 2014; Waters et al., 2018). De plus, la tolérance des plantes à la carence en fer pourrait être liée à leur capacité à stocker du fer dans l'apoplasme racinaire et à le remobiliser via l'activité des composés phénoliques fluorescents (Longnecker and Welch, 1990; Curie and Mari, 2017; Shi et al., 2018).

Par ailleurs, l'importance du microbiote de la plante sur sa croissance et sa santé est maintenant largement reconnue (Compant et al., 2019; Saleem et al., 2019). De très nombreuses études ont mis en évidence l'importance des microorganismes sur le statut en fer de la plante (Lurthy et al., revue destinée à être soumise à Agron. Sustain. Dev., présentée chapitre 1). On sait également que la plante influence fortement la composition de son microbiote en recrutant des microorganismes particuliers (Bulgarelli et al., 2013; Lemanceau et al., 2017a; Stringlis et al., 2018; Jones et al., 2019). Il a de plus été montré que des plantes ayant un statut en fer différent impactent différemment leur microbiote et que ces différences peuvent avoir en retour des conséquences sur la croissance et la santé de la plante (Robin et al., 2006, 2007; Jin et al., 2010). Dans ces études, les microorganismes concernés étaient des *Pseudomonas* spp. fluorescents et le statut en fer de la plante a eu un impact sur les sidérophores produits par ces bactéries. Du fait de leur très forte affinité pour le Fe^{3+} , ces sidérophores diminuent la biodisponibilité du Fe^{3+} pour les champignons phytopathogènes et ainsi réduisent la fréquence des infections racinaires et finalement la gravité de maladies d'origine tellurique (Kloepper et al., 1980; Duijff et al., 1999). Les travaux de Robin et al. (2007) ont effectivement montré, qu'un sidérophore particulier produit par des *Pseudomonas* sélectionnés par un tabac transgénique hyper accumulateur de fer présentait une forte activité antagoniste liée à la compétition pour le fer à l'encontre d'un oomycète phytopathogène (*Pythium aphanidermatum*). De plus, des *Pseudomonas* particulièrement aptes à résister à une carence en fer étaient sélectionnés dans la rhizosphère du tabac hyper accumulateur de fer. D'autres travaux ont aussi montré que les sidérophores des bactéries *Pseudomonas* spp. fluorescents et en particulier leur sidérophore principal, la pyoverdine (pvd), peuvent contribuer à la nutrition en fer de dicotylédones et de graminées (Vansuyt et al., 2007; Shirley et al., 2011). Plus récemment, l'induction de gènes d'*Arabidopsis* impliqués

dans l'acquisition et l'homéostasie du fer par un sidérophore de *Pseudomonas* a été mise en évidence (Trapet et al., 2016).

Sur la base de ces connaissances, il paraît intéressant de déterminer si des pois qui diffèrent par leur niveau de tolérance à la chlorose ferrique, et donc aussi dans leur capacité à acquérir et/ou à gérer le fer *in planta*, sont associés aux mêmes microorganismes. On portera un intérêt particulier aux *Pseudomonas* spp. fluorescents et aux pyoverdines qu'ils synthétisent compte tenu des effets importants déjà mis en évidence pour ces bactéries et leurs sidérophores principaux dans des travaux portant sur d'autres plantes.

Toutefois, les études de diversité des bactéries appartenant au genre *Pseudomonas* et, parmi elles, de celles appartenant au groupe des *Pseudomonas* spp. fluorescents (désigné ainsi par la capacité des bactéries le constituant à produire un sidérophore fluorescent à la lumière ultra violette, la pyoverdine), sont complexes. En effet, l'analyse des séquences partielles d'ADN codant l'ARN 16S (16S rRNA), utilisée généralement pour décrire la diversité taxonomique bactérienne, ne permet pas de décrire la diversité des *Pseudomonas* de façon satisfaisante (Kerstens et al., 1996; Mulet et al., 2010). De plus, la définition des espèces anciennement basée sur des critères phénotypiques a généré une taxonomie complexe. Des *Pseudomonas* portant un même nom d'espèce sont retrouvés dans différents groupes phylogénétiques. C'est le cas en particulier pour les *Pseudomonas fluorescens* et les *Pseudomonas putida* (Frey et al., 1997). Deux études importantes ont clarifié la taxonomie des *Pseudomonas* en définissant des complexes et des groupes taxonomiques basés sur la phylogénie (Gomila et al., 2015; Garrido-Sanz et al., 2016). Cependant, ces regroupements sont basés sur l'analyse des séquences de plusieurs gènes de ménage concaténés (16SrRNA, *gyrB*, *rpoB* et *rpoD*) ce qui gêne l'étude de la diversité des bactéries cultivées et ne permet pas de réaliser des études directes de communautés sans passer par l'isolement.

L'étude de la diversité des pyoverdines est également complexe. L'analyse des molécules nécessite de disposer de souches isolées. Différentes méthodes sont utilisées pour étudier la diversité des pyoverdines. La détermination de la composition de la chaîne peptidique de la pyoverdine, comportant de 6 à 14 acides aminés et constituant sa principale source de variabilité, ainsi que celle de sa chaîne latérale, peut être réalisée par spectrométrie de masse (MS) après purification par HPLC (Budzikiewicz, 2004; Meyer et al., 2007; Matthijs

et al., 2016). Une autre méthode, plus simple à mettre en œuvre et moins coûteuse, a été beaucoup utilisée dans l'étude des pyoverdines. Il s'agit de la réalisation de profils d'isoélectrofocalisation (IEF) (Koedam et al., 1994; Fuchs et al., 2001; Meyer et al., 2007) . Cette méthode consiste à faire migrer les molécules dans un champ électrique et à les séparer dans un gel selon leur point isoélectrique (pHi). Le pHi des pyoverdines dépend principalement de leur partie peptidique et des groupements hydroxyles, des parties variables et responsables de la spécificité de la molécule. L'analyse des pyoverdines par IEF, qui conduit à l'obtention de profils de bandes, présente toutefois l'inconvénient d'être moins précise et informative que l'analyse en MS.

Afin d'étudier la diversité des *Pseudomonas* spp. fluorescents et des pyoverdines associées pour un grand nombre d'isolats, mais aussi d'étudier directement des communautés de *Pseudomonas* sans isolement préalable, il a été nécessaire de rechercher des gènes marqueurs. Trois gènes ont été sélectionnés comme marqueurs potentiels. Il s'agit de *gacA*, un régulateur transcriptionnel global, ainsi que *pvdQ* et *pvdA*, deux gènes impliqués directement dans la synthèse des pyoverdines. Le régulateur de transcription *gacA* présente un double intérêt. Ce gène fonctionnel régule la transcription d'un ensemble de gènes impliqués dans des activités microbiennes qui, pour beaucoup, sont connues pour leur impact direct ou indirect dans les interactions plantes bactéries (Haas and Défago, 2005). Parmi ces activités, on trouve la synthèse des sidérophores mais aussi la synthèse de molécules ayant une activité antibiotique, le fonctionnement du système de sécrétion de type III ou la synthèse de molécules impliquées dans le quorum sensing. L'autre intérêt de ce gène est que différents auteurs ont rapporté une congruence entre des regroupements réalisés sur la base d'analyses de sa séquence et ceux réalisés à partir de l'analyse de séquences de marqueurs taxonomiques (De Souza et al., 2003; Costa et al., 2007). Bien que la source de variabilité principale des molécules de pyoverdine soit sa chaîne peptidique, les principaux gènes impliqués dans la synthèse de cette partie de la molécule n'ont pas été sélectionnés comme marqueurs potentiels de sa diversité. En effet, la chaîne peptidique est synthétisée par des synthétases peptidiques non-ribosomiques (Ringel and Brüser, 2018). Les enzymes de ce type sont codées par des gènes dont les séquences comportent beaucoup de motifs répétés rendant difficile la construction d'amorces spécifiques, en particulier si elles sont utilisées sur des acides nucléiques extraits directement du sol ou des racines. Les gènes choisis, *pvdA* et *pvdQ*, codent

respectivement (i) une oxygenase N5-L-ornithine, qui catalyse l'hydroxylation de la L-ornithine lors des premières étapes de la biosynthèse de la chaîne peptidique de la pyoverdine (Visca et al., 1994; Ge and Seah, 2006), et (ii) une acylase périplasmique, hydrolase nucléophile N-terminal éliminant le groupement acyle de la ferribactine une fois dans le périplasme (Clevenger et al., 2017; Ringel et al., 2017).

Dans une première partie, afin d'identifier des marqueurs de la diversité taxonomique et fonctionnelle des *Pseudomonas* spp. fluorescents, le polymorphisme des trois gènes (*gacA*, *pvdA* et *pvdQ*) a été étudié au sein d'une collection de souches de *Pseudomonas* de référence comportant des représentants des principaux groupes taxonomiques au sein desquels sont retrouvés les bactéries associées aux plantes. En parallèle, les types de *pvd* ont été déterminés sur la base des profils IEF de ces souches et leur polymorphisme a également été analysé. Les résultats des analyses du polymorphisme génétique et fonctionnel des souches de référence ont été comparés pour évaluer l'intérêt de l'utilisation de chacun des gènes comme marqueur de diversité. Dans une seconde partie, la diversité des *Pseudomonas* spp. fluorescents isolés des racines de deux cultivars de pois, l'un sensible (S), et l'autre tolérant (T), à la chlorose ferrique a été comparée sur la base du polymorphisme des gènes *gacA* et *pvdQ* et des IEF des pyoverdines produites afin (i) d'élargir à des souches inconnues, l'évaluation des marqueurs sélectionnés et (ii) de comparer les *Pseudomonas* spp. fluorescents associés aux deux types de pois et les pyoverdines qu'ils produisent. Dans une troisième partie, nous avons évalué l'aptitude de *Pseudomonas* et de pyoverdines représentatifs de la diversité décrite pour les deux cultivars de pois S et T, à protéger les plantes contre le phytopathogène *Aphanomyces euteiches*.

2. Matériels and méthodes

2.1. Souches microbiennes, plantes, et conditions de culture

Les souches microbiennes utilisées dans cette étude sont présentées dans le **Tableau 1**. La collection est constituée de 115 souches de référence et de 248 isolats provenant des racines de deux cultivars de pois, S et T ; 124 isolats proviennent de S (noms des souches commençant par D) et 124 de T (nom des souches commençant par B). Les souches de *Pseudomonas* ont été cultivées en milieu King B (King *et al.*, 1954) à 25°C. Pour le milieu solide, 15 g.l⁻¹ d'agar ont été ajoutés au milieu.

Deux pois d'hiver ont été choisis pour leur comportement contrasté concernant la résistance à la chlorose ferrique (IDC, Iron Deficiency Chlorosis) au champ : Balltrap, cultivar tolérant, et Dexter, cultivar sensible (P. Declerck, RAGT 2n, communication personnelle). Leur niveau de tolérance à la carence ferrique a été confirmé sur un large panel de cultivars de pois dont la sensibilité à la carence en fer a été comparée au champ et en serre (projet PersPEAcase RAGT-INRA, P. Declerck, C. Jeudy & C. Salon ; communication personnelle). Dans l'étude, ces deux cultivars seront nommés T (pour le tolérant, Balltrap) et S (pour le sensible, Dexter). Les graines des deux cultivars ont été semées au champ dans un sol calcaire de Champagne (Montardoise, France) avec une faible teneur en fer extractible (DTPA-Fe=10.3 ±0.34 mg.kg⁻¹) et un pH élevé (8.27 ±0.08). La composition du sol est donnée en **Annexe 1** (En données supplémentaires dans le manuscrit à soumettre). Pour chaque cultivar, quatre parcelles de 1 x 5m ont été semées en octobre 2016 (120 plantes m⁻²) et l'expérimentation a été conduite jusqu'à la récolte, fin Juin (Plantes âgées de 33 semaines). Les pois à partir desquels ont été isolés les *Pseudomonas* ont été récoltés en avril pendant la période de floraison (plantes âgées de 24 semaines). Cinq plantes ont été prélevées de façon aléatoire dans chacune des parcelles et ont été réunies pour constituer un échantillon composite. Au total, quatre échantillons composites ont donc été constitués par cultivar (1 par parcelle) : D1, D2, D3 et D4 pour le pois S et B1, B2, B3 et B4 pour le pois T. En Juin, les graines ont été récoltées pour les utiliser dans les expérimentations *in vitro* de protection contre la pourriture racinaire. Lors de l'échantillonnage, les racines et les parties aériennes ont été séparées. Les parties aériennes ont été séchées à 60 °C jusqu'à obtention d'une masse stable (c.a. 72h) et ont été pesées. Les racines ont été lavées 2 fois dans 100 ml d'eau MilliQ stérile. Les nodosités racinaires ont été

excisées et stockées. Les racines ont été découpées en petits fragments afin d'homogénéiser l'échantillon. Une partie a été utilisée pour les isolements bactériens et également pour les analyses des communautés, une autre a été lyophilisée et broyée en poudre fine pour être utilisée dans des analyses multiélémentaires.

Les essais de protection des plantes contre la pourriture racinaire par inoculation de souches de *Pseudomonas* ont été réalisés *in vitro*. Les graines récoltées au champ ont été calibrées puis désinfectées par trempage 5 min dans de l'éthanol 70% puis 15 min dans une solution de hypochlorite de calcium ($\text{Ca}(\text{ClO})_2$) à 1% filtrée. La désinfection a été suivie de 3 rinçages à l'eau MilliQ stérile puis d'un trempage dans de l'eau MilliQ stérile pendant 3 heures. Les graines ont ensuite été mises à germer dans des boîtes de Pétri contenant du papier filtre, sans cendres stérile et humidifié, à température ambiante et à l'obscurité pendant 4 jours. Après germination, les plantules ont été transférées individuellement dans des tubes à essais contenant un milieu nutritif contenant 15 g.l^{-1} d'agar de Sigma A1296 agar (Sigma-Aldrich, St. Quentin Fallavier, France). La solution nutritive était du milieu Hoagland contenant 5 mM KH_2PO_4 and $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$, 2,5 mM KNO_3 , 1 mM MgSO_4 , 50 μM H_3BO_3 , 5 μM MnSO_4 , 15 μM ZnSO_4 7 H_2O , 3 μM Na_2MoO_4 2 H_2O , 2,5 μM $\text{KI}(\text{H}_2\text{O})_7$ et CuSO_4 5 H_2O . Les plantules ont été cultivées en conditions contrôlées en chambre de culture : 16h de jour à 23°C, 8h de nuit à 20°C, 300 $\mu\text{mole.m}^{-1}\text{s}^{-1}$, humidité 70%. Les plantules ont été arrosées tous les 4 jours avec de la solution nutritive Hoagland diluée 4 fois.

2.2. Isolements bactériens et préparation de lysats cellulaires

Deux grammes de racines lavées et découpées ont été broyées dans 8 ml d'eau osmosée dans un mortier stérile. La suspension a été diluée et étalée sur un milieu KB supplémenté avec de la cycloheximide (100 mg.ml^{-1}), du chloramphenicol (13 mg.ml^{-1}), et de l'ampicilline (50 mg.ml^{-1}) pour isoler les *Pseudomonas* (Geels and Schippers, 1983). Les boîtes de Pétri ont été incubées pendant 48h à 25 °C. Vingt colonies présentant une fluorescence sous lampe UV (365 nm) ont été collectées à partir des 4 échantillons composites de chaque cultivar soit 80 isolats par cultivar. Pour chaque échantillon composite, dix nodosités ont été choisies aléatoirement, puis désinfectées par trempage 3 min dans une solution de hypochlorite de calcium ($\text{Ca}(\text{ClO})_2$) à 1% filtrée. La désinfection a été suivie de 3 rinçages à l'eau MilliQ stérile. Chaque nodosité a été broyée individuellement dans 200 μl d'eau stérile. Chaque suspension

a été étalée sur le milieu KB modifié supplémenté en antibiotiques décrit précédemment pour isoler les *Pseudomonas*. Les isolats ont été purifiés par étalement en stries épuisantes et conservés à -80°C dans du milieu liquide contenant du glycérol à 25%. Des lysats de cultures bactériennes ont été utilisés pour les amplifications par PCR. Ils ont été préparés à partir des isolats inoculés sur milieu KB et cultivés 48h à 25°C (Raaijmakers et al., 1997). Pour chaque isolat, une colonie isolée a été suspendue dans 100 µl de solution de lyse (0.05 M NaOH, 0.25% sodium dodecyl sulfate (SDS)) et incubée 15 min à 100°C. La suspension a été centrifugée pendant 1 min à 12 000 r.p.m et une dilution 50X dans de l'eau stérile a été préparée et conservée à -20°C.

2.3. Analyse de la structure et de la diversité des communautés bactériennes

Extraction, purification et quantification des ADN

Les racines des huit échantillons de pois ont été broyées dans l'azote liquide et lyophilisées. 250 mg de chaque échantillon ont été utilisés pour l'extraction d'ADN, selon le protocole ISO standard 11063 « Soil quality-Method to directly extract DNA from soil samples » (Petric et al., 2011; Plassart et al., 2012). Le protocole d'extraction d'ADN se compose de trois étapes : (i) une lyse mécanique au Fast-Prep (MP Biomedicals, Illkirch-Graffenstaden, France) pendant 30 s, à 1600 rpm, dans 1 ml d'un tampon de lyse contenant 100 mM Tris HCl pH 8, 100 mM d'acide d'éthylène diamine tétra-acétique (EDTA) pH 8, 100 mM de NaCl et du sodium dodécyl sulfate (SDS) 2%, (ii) une déprotéinisation à l'acétate de potassium 3M pH 5,5, suivie par une précipitation des acides nucléiques avec de l'isopropanol à -20°C pendant 30 min et une resuspension dans 100 µl de TE pH 8, (iii) une purification par kit GeneClean Turbo (MP BioMedical, Illkirch-Graffenstaden, France) selon le protocole du fournisseur. La qualité des ADN obtenus a été contrôlée par électrophorèse sur gel d'agarose à 1%. L'observation des bandes génomiques a été réalisée via une caméra et le logiciel « Infinity Capt » (Vilber Lourmat, Marne-la-Vallée, France) sous ultraviolets (UV), après coloration au bromure d'éthidium (BET) (2 mg/L). La quantification des ADN a été faite en utilisant le kit Quant-IT dsDNA High Sensitivity Assay (Invitrogen, Carlsbad, CA, US), à l'aide du logiciel « Step one plus real time PCR systems », selon le protocole du fournisseur.

Amplification des séquences 16S ARNr des ADN :

La première étape pour la préparation d'une banque 16S ARNr pour séquençage à haut débit Illumina MiSeq 2 x 250 bp consiste à effectuer deux PCR : une PCR1, dont l'objectif est d'amplifier l'amplicon d'intérêt, et une PCR2, dont l'objectif est d'intégrer sur l'amplicon l'index et les adaptateurs Illumina. L'amplicon ciblé est la région hypervariable V3-V4 du gène 16S ARNr.

Les amorces utilisées pour la PCR1 sont ROPro805R 5'-GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAGGACTACNVGGGTATCTAATCC-3' et FOPro341F 5'-TCGTCCGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAGCCTACGGGNBGCASCAG-3' (Eurogentec, Seraing, Belgium) (Takahashi et al., 2014). La réaction de PCR1 a été préparée avec 1x de tampon 10X Advantage 2 PCR Buffer (Ozyme, Saint-Cyr-l'Ecole, France), 10 mM de dNTP (MP BioMedical, Illkirch-Graffenstaden, France), 12,5 µM de chaque amorce, 1,5 U de 50x Advantage 2 Polymerase Mix (Ozyme, Saint-Cyr-l'Ecole, France) et 10 ng d'ADN dans un volume final de 25 µl. La PCR2 a été effectuée à partir de 5 ng de l'amplicon obtenu lors de la PCR1, en suivant le même protocole que celui pour la PCR1, sauf pour les amorces avec adaptateurs Illumina (Eurogentec, Seraing, Belgique), qui sont les mêmes que la PCR1, mais précédées par une séquence de 10 bp, les index et les adaptateurs forward et reverse pour séquençage Illumina, respectivement.

Les réactions de PCR ont été effectuées dans le thermocycleur ABI Applied Biosystem 9700 (Fisher Scientific, Illkirch, France) selon les conditions suivantes : une dénaturation initiale à 94°C pendant 2min, suivie par 30 cycles (PCR1) ou 8 cycles (PCR2) de dénaturation à 94°C pendant 30sec, hybridation à 55°C pendant 30 sec et élongation à 72°C pendant 1 min. Une élongation finale est effectuée à 72°C pendant 7min.

Purification des produits PCR

Les amplicons 16S ARNr ont été purifiés après chaque PCR par kit Ampure (Beckman, US), en suivant les indications du fournisseur, et quantifiés comme décrit au paragraphe « Extraction, purification et quantification des ADN ». Un mélange équimolaire a été préparé en suivant les indications de GenoScreen (France), prestataire de service qui a effectué le séquençage à haut débit (Illumina MiSeq 2x300bp).

2.4. Sensibilité des souches bactériennes à la carence en fer

Les isolats bactériens ont été cultivés 24h en milieu KB solide et ont été suspendus en plaque de microtitration dans 100 µl d'eau milliQ stérile pour être inoculés sur milieu succinate solide pH 7 (Meyer et Abdallah, 1978) avec un peigne en métal (longueur, 7cm, largeur, 5,5 cm ; hauteur, 1,5 cm ; 48 branches). Le milieu succinate a été supplémenté, ou non, avec 2, 4, 8, 16, 32, 64, 128 mg.ml⁻¹ de 8-hydroxyquinoline (8HQ ; Sigma, France) en présence ou non avec de fer (en concentration équimolaire à celle de la 8HQ). Chaque inoculation a été répliquée indépendamment 3 fois. Les boîtes de cultures ont été incubées 72h à 25°C. La concentration minimale inhibitrice (CMI) de 8HQ induisant la suppression de la croissance bactérienne a été identifiée pour chaque isolat.

2.5. Analyse du fond génétique des isolats par BOX-PCR

Des empreintes génétiques, basées sur l'amplification par PCR des séquences répétées BOX présentes dans le génome bactérien, ont été utilisées pour caractériser le fond génétique des isolats bactériens (Versalovic et al., 1994). La réaction PCR a été réalisée dans un volume total de 25 µl et contenait: 5µl de tampon Gitschier (67 ml de (NH₄)₂SO₄ 1M dans du tampon Tris-HCl pH 8,8, 6,7 ml de MgCl₂ 1M, 1,3 ml d'une dilution 1/100 de 0,5 M EDTA pH 8,8, 2,08 ml de β-mercaptoethanol 14,4 M, additionné à 200ml d'eau MilliQ), 0,4 µl de BSA (10 mg.l⁻¹, Promega, France), 1,25 µl de dNTP (25 mM de chaque nucléotide; Promega, France), 2,5 µl de DMSO 100% (Sigma, St. Quentin Fallavier, France), 1 µl d'amorce (BOXA1R, 10µM, 5'-CTACGGCAAGGCGACGCTGACG-3', Eurogentec, Seraing, Belgique), 0,15 µl de Goldstar Taq polymérase 15U/µl (Eurogentec, Seraing, Belgique) et 5µl de lysat bactérien. Le programme PCR a été exécuté dans un thermocycleur Biometra Tprofessional family (Labgene, France) selon le cycle suivant : 95 °C 2 min, 30 cycles de 94 °C 30 s, 92°C 30sec - 50° C 1 min – 65 °C 8 min, 65 °C 16 min. Cinq microlitres de chaque produit PCR ont été déposés dans un gel d'agarose (Eurogentec, Seraing, Belgique) à 1,5% dans un tampon 1x Tris-acetate-EDTA (EDTA, 0,01 M, Tris-acetate, 0,04 M, pH 8,2). L'électrophorèse a été réalisée à 40 V pendant 4 h. Un marqueur de taille 1 kb (Invitrogen) était intégré dans chaque gel. Le gel a été révélé avec du bromide d'éthidium (1 mg.ml⁻¹) et les produits d'amplifications ont été visualisés sous UV (Biocaptsoftware version 99.0385, Vilbert Lourmat, Marne La Vallée, France).

2.6. Caractérisation des pyoverdines par focalisation isoélectrique (IEF)

La focalisation isoélectrique est une méthode pour différencier les pyoverdines selon la structure de la partie peptidique du sidérophore (Fuchs et al., 2001; Meyer et al., 2002). Pour la production de pyoverdine, chaque isolat a été cultivé dans 10ml de milieu casamino acid (CAA) appauvri en fer dans un Erlenmeyer de 50 ml (Meyer et al., 1997). Les cultures bactériennes ont été incubées en rotation (150 r.p.m) à l'obscurité à 25°C pendant 36h. Les analyses ont été réalisées selon la méthode décrite par Koedam et al., (1994) et modifiée par Meyer et al., (1998). Brièvement, l'électrophorèse isoélectrique a été réalisée en cuve 111 mini-IEF Cell de Bio-Rad (Ivry-sur-Seine, France). Un gel polyacrylamide à 5% (125 x 65 x 0.4 mm) contenant 2% de Bio-Lyte 3–10 ampholines (Bio-Rad, Ivry-sur-Seine, France) créant un gradient de pH de 3,5 à 9,2 a été réalisé selon les recommandations du fabricant. Deux microlitres d'échantillon concentré 20 fois par lyophilisation ont été déposés sur le gel. L'électrophorèse a été réalisée en 3 étapes à 4°C : 15 min à 100 V, 15 min à 200 V et 1 h à 450 V. Les bandes des pyoverdines ont été visualisées immédiatement après électrophorèse sous UV à 365 nm et leur point isoélectrique (pHi) a été déterminé en utilisant un standard interne contenant un mélange de pyoverdines purifiées connues.

2.7. Amplifications PCR et séquençage

Les amorces *pvdA*, *pvdQ* et les amorces *gacA* dérivées de celles décrites par Costa et al., (2007) ont été synthétisées par Eurogentec (Seraing, Belgique). Les PCR ont été exécutées dans un volume réactionnel total de 25 µl contenant 5 µl de Tampon 5X (pack Gp Taq, Promega), 1,5 µl MgCl₂ (25 mM), 0,2 µl dNTPs (25 mM de chaque, Promega), 1,25 µl de chaque amorce (*pvdA* et *pvdQ* : 10 µM ; *gacA* : 30 µM), 0.125 µl Taq polymérase G2 flexi (Promega) et 5 µl de lysat bactérien. L'amplification PCR a été réalisée dans un thermocycleur Biometra Tprofessional family (Labgene, France) selon le cycle thermique suivant : 3 min à 95°C, 35 cycles de 1 min à 94 °C, 1 min30 à 51°C pour *pvdQ* ou à 58°C pour *gacA*, et 3 min à 72°C, 3 min à 72°C. Les produits de l'amplification PCR ont été analysés et quantifiés en gels d'agarose avec le logiciel Imagequant TL 7.0. Les produits de PCR ont été séquencés par un prestataire de service après préparation selon ses instructions (Sanger sequencing, Eurofins, Allemagne).

2.8. Production des zoospores d'*Aphanomyces euteiches*

À partir d'une culture d'*A. euteiches* RB84 de 7 jours sur milieu CMA (10 g de corn meal agar, Sigma-Aldrich, St. Quentin Fallavier, France) et 10 g d'agar (Kalys, Bernin, France), 20 implants de mycelium ont été incubés dans 50 ml de milieu liquide contenant du Bacto peptone 2% (Peptone enzymatic hydrolysate Fluka, Buchs, Switzerland) et du glucose 0,5% pendant 24h. La culture a été lavée 3 fois en remplaçant, successivement toutes les 2 heures à l'obscurité à 23°C, le milieu par de l'eau minérale stérile (Volvic, France) : 2x150 ml puis 1x 100ml. Un dernier lavage a été effectué avec 20 ml d'eau de Volvic stérile. La culture a été incubée une nuit à 23°C à l'obscurité. Les zoospores contenues dans la culture ont été comptées en utilisant une cellule de Malassez sous microscope.

2.9. Antagonisme in vitro des pyoverdines purifiées à l'encontre d'*A. euteiches*

L'activité antagoniste des pyoverdines de *Pseudomonas* spp. fluorescents à l'encontre d'*A. euteiches* RBO4 a été étudiée en boîte de Pétri. Quinze milles zoospores apportées dans 500 µl d'eau de Volvic ont été uniformément étalées sur une boîte de Pétri (9cm) contenant 20 ml du milieu solide KB. Après 1 heure de séchage, trois disques de papier filtre de 6 mm de diamètre (bioMérieux, Marcy l'étoile, France) imprégnés avec 65 nmoles de pyoverdines non chélatées au fer ont été positionnées à 4,2 cm du centre de la boîte de pétri de manière équidistante (**Figure S2**). Des boîtes contenant des disques imprégnés d'eau stérile ou de ferripyoverdine ont été utilisées comme témoins. Les boîtes de Pétri ont été incubées à 25°C pendant 48h. L'intensité de l'activité antagonisme a été exprimée en calculant l'aire d'antagonisme.

2.10. Protection du pois contre la pourriture racinaire par inoculation de souches de *Pseudomonas*

Les bactéries ont été cultivées en boîte de Pétri sur milieu KB et incubées 48h à 25°C. Après avoir resuspendu la culture dans 10 ml d'eau stérile MilliQ, la densité optique (DO : 600 nm) a été mesurée afin d'évaluer la concentration bactérienne et c.a. 10^7 bactéries en suspension dans 75 µl d'eau MilliQ stérile ont été déposées sur les racines à l'étape de

transplantation des plantules dans les tubes à essais. De sept à dix plantes ont été inoculées par souche. Les plantes correspondant au traitement témoin ont reçu un volume d'eau équivalent à celui des inocula bactériens. Après 5 jours de culture en conditions contrôlées (16h de jour / 8h de nuit ; 20°/23°C) 125 zoospores d'*A. euteiches* souche RB84 ont été apportées dans 75 µl d'eau de Volvic stérile. Les tubes à essais ont été supplémentés avec 5 ml de solution nutritive Hoagland. La gravité de la maladie a été évaluée par notation visuelle selon l'échelle de Wicker et al. (2001) chaque jour durant 21 jours : 0 : absence de symptômes, 1 : traces translucides à beige, 3 : zones beiges couvrant ¼ des racines, 5 : zones beiges couvrant ½ des racines, 7 : zones beiges couvrant ¾ des racines, 9 : mort de la plante. L'aire sous la courbe de la progression de la maladie (AUDPC) a été calculée. Les pourcentages de plantes mortes ont été évalués 18 jours et 21 jours après inoculation du pathogène.

2.11. Analyses des données

Toutes les analyses statistiques ont été effectuées sous environnement R (version 3.4.4), en utilisant les packages suivants : ggplot2 (Wickam, 2016), phyloseq (McMurdie & Holmes, 2013) et vegan (Oksanen et al., 2007).

Un test exact de Fisher a été appliqué sur les données de distribution ayant des effectifs inférieurs à 5 pour les CMI de 8HQ, la distribution des profils BOX-PCR et la distribution des groupes taxonomiques de *Pseudomonas* associés aux profils de pyoverdines majoritaires. Un test du χ^2 de Pearson a été appliqué sur la distribution des 6 principaux types de pyoverdines produites. Les données d'antagonismes (aire d'antagonisme, AUDPC) ont été soumises à une analyse de la variance à un paramètre (ANOVA) suivie par le test Post-Hoc, LSD-plus petite différence significative de Fisher, avec une correction de Bonferroni.

Pour définir les types BOX-PCR et IEF, des matrices de similarités ont été calculées en utilisant la méthode Jaccard. Ces matrices ont été utilisées pour construire un dendrogramme sous environnement R en utilisant les package : ade4 (dist.binary) et stats package (hclust). Les regroupements obtenus ont servi de base à la définition des types

Les alignements multiples des séquences *pvdA*, *pvdQ* ou *gacA*, ont été réalisés avec CLUSTAL Omega (Sievers et al., 2011) via le logiciel libre d'accès SeaView (<http://doua.prabi.fr/software/seaview>). Les arbres ont été construits selon la méthode

neighbour joining (NJ) (Saitou and Nei, 1987) en calculant les distances génétiques selon le modèle de Kimura à deux paramètres (Kimura, 1980) en utilisant le logiciel libre d'accès Mega7 (<https://www.megasoftware.net/>). Les valeurs de Bootstrap ont été calculées sur 1000 répétitions.

Les séquences 16S ARNr forward R1 et reverse R2 obtenues ont été analysées en utilisant l'application Jupyter Notebook (Kluyver et al., 2016), où sont assemblées différents outils bioinformatiques. Les séquences R1 et R2 ont été assemblées en utilisant PEAR (Zhang et al., 2014) avec ses paramètres de défaut. Les contrôles qualité ont été faits avec le pipeline QIIME (Caporaso et al., 2010) : les séquences inférieures à 440 bp ont été enlevées. La détection de chimères (sur base de données et *de novo*), ainsi que le clustering en OTUs ont été effectués en utilisant VSEARCH (Rognes et al., 2016) et la base de données Greengenes (version 05/2013, McDonald et al., 2012). Le seuil d'identité choisi est 97%. Les séquences représentatives de chaque OTU ont été alignées avec PyNAST (Caporaso et al., 2010). La taxonomie a été assignée en utilisant UCLUST (Edgar, 2010) et la base de données Greengenes.

Tableau 1. Liste et caractéristiques des souches de *Pseudomonas* spp. fluorescents utilisés pour cette étude

Nom de souche	Espèces	Référence ⁺	<i>pvdA</i>	<i>pvdQ</i>	<i>gacA</i>	BOX	IEF
NEM4124	<i>P. fluorescens</i>	(Robin et al., 2007)	Co-b4 ⁽¹⁾	Co-a4	Co-b6		a
NEM419	<i>P. fluorescens</i>	(Robin et al., 2007)	Co-b4	Co-a4	Co-b6		a
MTRJ5625	<i>Pseudomonas</i> sp.	(Viollet et al., 2011)	na	Co-a2	Co-b7		a
MTE48106	<i>Pseudomonas</i> sp.	(Viollet et al., 2011)	Co-b6	Co-a2	Co-b7		a
F113	<i>P. kilonensis</i>	(Shanahan et al., 1992)	Co-b6	Co-a2	Co-b8		a
MTE48105	<i>Pseudomonas</i> sp.	(Viollet et al., 2011)	Co-a1	Co-b	Co-a		b
Pf29Arp	<i>P. fluorescens</i>	(Sarniguet et al., 1997)	Co-a1	Co-b	Co-a		b
MTEJ5606	<i>Pseudomonas</i> sp.	(Viollet et al., 2011)	Co-a1	Co-b	Co-a		b
KD	<i>P. fluorescens</i>	(Rezzonico et al., 2004)	Co-a3	Co-a8	Co-b1		b
CTR1015	<i>P. fluorescens</i> bvII	(Delorme et al., 2002)	Co-a3	Co-a8	Co-b1		b
Q2-87	<i>P. fluorescens</i>	(Vincent et al., 1991)	Co-a2	Co-a9	Co-b3		b
DSM13227 ^T	<i>P. brassicacearum</i>	(Achouak et al., 2000)	Co-b3	Co-a3	Co-b9		b
Q8r1-96	<i>P. brassicacearum</i>	loper	Co-b3	Co-a3	Co-b9		b
DSM13647 ^T	<i>P. kilonensis</i>	<i>Not found</i>	Co-b5	Co-a1	Co-b10		c
C7R12	<i>P. fluorescens</i> bvII	(Lemanceau 1991)	Co-b1	Co-a7	Co-b4		c
MTRJ5422	<i>Pseudomonas</i> sp.	(Viollet et al., 2011)	Co-b1	Co-a7	Co-b4		c
MTS2112	<i>Pseudomonas</i> sp.	(Viollet et al., 2011)	Co-b1	Co-a7	Co-b4		c
MTRJ5326	<i>Pseudomonas</i> sp.	(Viollet et al., 2011)	na	Co-a7	Co-b4		c
MTE48702	<i>Pseudomonas</i> sp.	(Viollet et al., 2011)	Co-b1	Co-a6	Co-b4		c ⁽²⁾
MTEJ5305	<i>Pseudomonas</i> sp.	(Viollet et al., 2011)	Co-b1	Co-a6	Co-b4		c-
CFBP5754 ^T	<i>P. thivervalensis</i>	(Achouak et al., 2000)	Co-b2	Co-a5	Co-b5		c-
DSM26522 ^T	<i>P. yamanorum</i>	(Arnau et al., 2015)	Ge	Ge-a	Ge-b		c
A6	<i>P. fluorescens</i>	(Lemanceau 1983)	Ko-b2	Ko-b1	Ko-a2		c
CTRp112	<i>P. fluorescens</i> bvVI	(Lemanceau 1994)	Ko-b5	Ko-b6	Ko-b		c
DSM26532 ^T	<i>P. baetica</i>	(López et al., 2012)	Ko-b1	Ko-b5	Ko-d		c
DSM16610 ^T	<i>P. koreensis</i>	(Kwon et al., 2003)	-	Ko-b7	Ko-f1		c
CS111	<i>Pseudomonas</i> sp. bvA	(Lemanceau 1994)	na	Ma-d	Ma-2		c
ATCC17484	<i>Pseudomonas</i> sp.	(Barnsley 1976)	-	Ma-b	Ma-c1		c
SB8.3	<i>Pseudomonas</i> sp.	(Demange et al., 1986)	Ma-e	Ma-a	Ma-c2		c
CLRp214	<i>Pseudomonas</i> sp.	(Ghirardi et al., 2012)	na	Ma-d	Ma-d1		c
ChPhzLR105	<i>P. fluorescens</i>	(Mazurier et al., 2009)	Ma-d	Ma-c	Ma-d2		c
Pf0-1	<i>P. fluorescens</i>	(Silby et al., 2009)	Ko-a	Ko-a	Ko-c		d
51W	<i>P. fluorescens</i>	(Voss et al., 1999)	Ge	Ge-b	Ge-a		d
CFBP4840 ^T	<i>P. gessardii</i>	(Verhille et al., 1999)	Ge	Ge-b	Ge-a		d
B-Exp9	<i>Pseudomonas</i> sp.	(Mazurier et al., 2015)	Ko-c	Ko-b8	Ko-f2		d
CFBP11400	<i>P. fluorescens</i> bvl	<i>Not found</i>	Ko-b4	Ko-b4	Ko-a4		f
NEM3113	<i>Pseudomonas</i> sp.	(Robin et al., 2007)	Ko-b6	Ko-d2	Ko-e1		f
NEM3128	<i>Pseudomonas</i> sp.	(Robin et al., 2007)	Ko-b6	Ko-d1	Ko-e1		f
ChPhzLR107	<i>P. fluorescens</i>	(Mazurier et al., 2009)	Ko-b7	Ko-d1	Ko-e2		f
NEWT4273	<i>P. fluorescens</i>	(Robin et al., 2007)	Ko-b7	Ko-d1	Ko-e2		f
NEWT4282	<i>P. fluorescens</i>	(Robin et al., 2007)	Ko-b7	Ko-d1	Ko-e2		f
ATCC17513	<i>P. fluorescens</i> bvIV	<i>Not found</i>	Mo-a6	Ma-e5	Ma-a5		f

Tableau 1. Suite

Nom de souche	Espèces	Référence	<i>pvdA</i>	<i>pvdQ</i>	<i>gacA</i>	BOX	IEF
MTS3116	<i>Pseudomonas</i> sp.	(Viollet et al., 2011)	Ma-b	Ma-e7	Ma-a1		g
MTR48721	<i>Pseudomonas</i> sp.	(Viollet et al., 2011)	Ma-b	Ma-e7	Ma-a1		g
MTRJ5121	<i>Pseudomonas</i> sp.	(Viollet et al., 2011)	Ma-b	Ma-e7	Ma-a1		g
DLRp214	<i>P. lini</i>	(Delorme et al., 2002)	Ma-a3	Ma-e2	Ma-a2		g
CS611	<i>P. lini</i>	(Delorme et al., 2002)	Ma-a1	Ma-e1	Ma-a4		g
DTR335	<i>P. lini</i>	(Delorme et al., 2002)	Ma-a1	Ma-e3	na		g
CLRp812	<i>P. lini</i>	(Delorme et al., 2002)	Ma-a1	Ma-e1	na		g
CLE513	<i>P. lini</i>	(Delorme et al., 2002)	Ma-a1	Ma-e1	na		g
DS131	<i>P. jessenii</i>	(Delorme et al., 2002)	Je	Je	Je		h
DSM17150 ^T	<i>P. jessenii</i>	(Verhille et al., 1999)	Je	Je	Je		h
DTRp621	<i>P. jessenii</i>	(Delorme et al., 2002)	Je	Je	na		h
DLE3216	<i>P. jessenii</i>	(Delorme et al., 2002)	Je	Je	Je		h
DLR228	<i>P. jessenii</i>	(Delorme et al., 2002)	Je	Je	Je		h
CFBP3280 ^T	<i>P. blatchfordae</i>	Not found	-	Fl-c6	Fl-c2		i
CFBP4841 ^T	<i>P. libanensis</i>	(Dabboussi et al., 1999)	Fl-a2	Fl-c5	Fl-c2		i
DC3000	<i>P. syringae</i> pv tomato	Not found	-	Sy	Sy		j
1448A	<i>P. syringae</i> . pv phaseolicola	(Teverson 1991)	-	Sy	Sy		j
B728a	<i>P. syringae</i>	Not found	-	Sy	Sy		j
CFBP2213 ^T	<i>P. syringae</i> . pv atrofaciens	(Mac Culloch 1920)	-	Sy	Sy		j
CFBP2214 ^T	<i>P. syringae</i> . pv glycinea	(Coerper et al. 1919)	-	Sy	Sy		j
CFBP1392 ^T	<i>P. syringae</i> . pv syringae	(Sabet K.A. 1950)	-	Sy	Sy		j
CFBP2107 ^T	<i>P. viridiflava</i>	(Burkholder et al. 1930)	-	Sy	Sy		j
CFBP2022 ^T	<i>P. salomonii</i>	(Samson 1976)	Fl-b4	Fl-c3	Fl-a2		k
30-84	<i>P. chlororaphis</i>	(Pierson 2010)	Ch-c2	Ch-b2	Ch-b2		m
ChPhzS26	<i>P. chlororaphis</i>	(Mazurier et al., 2009)	Ch-a	Ch-a1	Ch-a1		m
DTR133	<i>P. chlororaphis</i>	(Ghirardi et al., 2012)	Ch-a	Ch-a1	Ch-a1		m
PGS12	<i>P. chlororaphis</i>	Not found	Ch-b2	Ch-a2	Ch-a3		n
CFBP2132 ^T	<i>P. chlororaphis</i>	(Guignard 1894)	Ch-c1	Ch-b1	Ch-b1		n
ok2T	<i>P. lutea</i>	Not found	-	Lu	Lu		nd
9AW	<i>P. fluorescens</i>	(Budzikiewicz 1997)	Ma-c2	Ma-f2	Ma-b2		nd
DSM11363 ^T	<i>P. gramini</i>	(Behrendt et al., 1999)	-	-	Lu		nd
CFBP2101 ^T	<i>P. cichorii</i>	(Kotte 1921)	-	-	Sy		nd
CFBP2443T	<i>P. stutzeri</i>	(Lautrop)	-	-	St		nd
CFBP2431 ^T	<i>P. corrugata</i>	(Slade 1972)	-	-	Co-b2		nd
CFML90-60 ^T	<i>P. monteilii</i>	(Elomari et al., 1997)	Pu-a5	Pu-a4	Pu-a2		nd
7NSK2	<i>P. aeruginosa</i>	(Iswandi et al., 1987)	Ae-b	Ae	Ae		nd
IH5T	<i>P. rhizosphaerae</i>	(Alvaro Peix 1997)	na	-	x		nd
DSM19186	<i>P. mucidolens</i>	(Levine,Anderson 1932)	Ge	Ge-b	Ge-a		nd

Tableau 1. Suite

Nom de souche	Espèces	Référence	<i>pvdA</i>	<i>pvdQ</i>	<i>gacA</i>	BOX	IEF
Pa6	<i>P. aeruginosa</i>	(Gipp et al., 1991)	Ae-a	Ae	Ae		o
AS72	<i>P. aeruginosa</i>	<i>Not found</i>	Ae-a	Ae	Ae		o
LESB58	<i>P. aeruginosa</i>	<i>Not found</i>	Ae-a	Ae	Ae		o
ATCC17386	<i>P. protegens</i> bvV	(Stanier R.Y)	Pr	Pr	Pr		p
ChPhzS24	<i>P. chlororaphis</i>	<i>Not found</i>	Ch-b2	Ch-a3	Ch-a2		p
Pf-5	<i>P. protegens</i>	(Howell 1979)	Pr	Pr	Pr		p
CHAO ^T	<i>P. protegens</i>	(Stutz E.W., Défago G)	Pr	Pr	Pr		p
KT2440	<i>P. putida</i>	<i>Not found</i>	Pu-a1	Pu-a1	Pu-a1		q
WCS358	<i>P. putida</i>	(Berendsen et al.,2015)	Pu-b	Pu-b2	Pu-c		q
L1	<i>P. putida</i>	<i>Not found</i>	-	Pu-b2	Pu-c		q
CFML92-104	<i>P. rhodesiae</i>	(Elomari 1992)	Fl-a3	Fl-d1	Fl-a5		s
N-Exp10	<i>Pseudomonas</i> sp.	(Mazurier et al., 2015)	Fl-a1	Fl-a2	Fl-a1		s
N-Exp11	<i>Pseudomonas</i> sp.	(Mazurier et al., 2015)	Fl-a1	Fl-a2	Fl-a1		s
WCS374	<i>P. defensor</i>	(Berendsen et al.,2015)	Fl-a1	Fl-a3	Fl-a1		s
DSM14020 ^T	<i>P. rhodesiae</i>	(Coroler et al., 1997)	Fl-a3	Fl-d1	Fl-a5		s
DSM14936 ^T	<i>P. poae</i>	(Behrendt et al., 2003)	Fl-b1	Fl-b1	Fl-b1		s
DSM14937 ^T	<i>P. trivialis</i>	(Behrendt et al., 2003)	Fl-b2	Fl-b2	Fl-b2		s
CFBP2037 ^T	<i>P. marginalis</i> . pv <i>marginalis</i>	(Friedman et al., 1949)	Fl-a4	Fl-d2	Fl-c1		s
ATCC17826	<i>P. fluorescens</i>	(Lautrop)	Fl-a4	na	Fl-c1		s
ATCC17397	<i>P. fluorescens</i> bv I	(Stanier et al., 1966)	Fl-a6	Fl-d7	Fl-c6		s
SBW25	<i>P. fluorescens</i>	(Silby et al., 2009)	Fl-a6	Fl-d7	Fl-c6		s
WCS417	<i>P. simiae</i>	(Berendsen et al.,2015)	Fl-a5	Fl-d5	Fl-c8		s
ATCC17400	<i>P. fluorescens</i> bvIII	(Stanier R.Y)	Ge	Ge-b	Ge-a		u
CFBP2810 ^T	<i>P. gingeri</i>	(Preece 1981)	-	x	x		u1
CFBP2063 ^T	<i>P. agarici</i>	(Young 1969)	x	x	x		u2
CFBP2068 ^T	<i>P. tolaasii</i>	(Gandy 1965)	Fl-b6	Fl-c2	Fl-a3		u3
CFML90-40	<i>P. putida</i>	<i>Not found</i>	Pu-a4	Pu-a5	Pu-a3		u4
PAO1	<i>P. aeruginosa</i>	<i>Not found</i>	Ae-a	Ae	Ae		u5
DLE411J ^T	<i>P. lini</i>	(Ghirardi et al., 2012)	Ma-a2	Ma-e6	Ma-a3		u6
ATCC27853	<i>P. aeruginosa</i>	(Ghirardi et al., 2012)	Ae-b	Ae	Ae		u7
B-Hemo1	<i>P. mosselii</i>	(Mazurier et al., 2015)	-	-	Pu-d2		v
N-Hemo5	<i>P. mosselii</i>	(Mazurier et al., 2015)	-	Pu-d1	Pu-d2		v
BBc6	<i>P. fluorescens</i>	<i>Not found</i>	Ge	Ge-a	Ge-b		y
PS3a ^T	<i>P. costantinii</i>	<i>Not found</i>	Fl-b5	Fl-d3	Fl-c3		y

Tableau 1. Suite

Nom de souche	Espèces	Référence	<i>pvdA</i>	<i>pvdQ</i>	<i>gacA</i>	BOX	IEF
Isolats des cultivars de pois S et T							
B26N2	<i>Pseudomonas</i> sp.	Cette étude	na	Fl-d8	Fl-c9	1 (51)*	t (58) ^o
B3210	<i>Pseudomonas</i> sp.	Cette étude	na	Fl-d8	Fl-c9	1	t
<u>B426</u>	<i>Pseudomonas</i> sp.	Cette étude	na	Fl-d8	Fl-c9	1	t
D1219	<i>Pseudomonas</i> sp.	Cette étude	na	Fl-d8	Fl-c9	1	t
D38N2	<i>Pseudomonas</i> sp.	Cette étude	na	Fl-d8	Fl-c9	1	t
D49N2	<i>Pseudomonas</i> sp.	Cette étude	na	Fl-d8	Fl-c9	1	t
B1215	<i>Pseudomonas</i> sp.	Cette étude	na	Ko-b2	Ko-a3	2 (31)	d (45)
B3214	<i>Pseudomonas</i> sp.	Cette étude	na	Ko-b2	Ko-a3	2	d
D15N1	<i>Pseudomonas</i> sp.	Cette étude	na	Ko-b2	Ko-a3	2	d
D210N1	<i>Pseudomonas</i> sp.	Cette étude	na	Ko-b2	Ko-a3	2	d
D337	<i>Pseudomonas</i> sp.	Cette étude	na	Ko-b2	Ko-a3	2	d
<u>D4214</u>	<i>Pseudomonas</i> sp.	Cette étude	na	Ko-b2	Ko-a3	2	d
<u>B326</u>	<i>Pseudomonas</i> sp.	Cette étude	na	Ko-c	Ko-a1	3 (12)	d
B38N1	<i>Pseudomonas</i> sp.	Cette étude	na	Ko-c	Ko-a1	3	d
D2219	<i>Pseudomonas</i> sp.	Cette étude	na	Ko-c	Ko-a1	3	d
D22N3	<i>Pseudomonas</i> sp.	Cette étude	na	Ko-c	Ko-a1	3	d
D27N1	<i>Pseudomonas</i> sp.	Cette étude	na	Ko-c	Ko-a1	3	d
D3311	<i>Pseudomonas</i> sp.	Cette étude	na	Ko-c	Ko-a1	3	d
D333	<i>Pseudomonas</i> sp.	Cette étude	na	Ko-c	Ko-a1	3	d
D41N1	<i>Pseudomonas</i> sp.	Cette étude	na	Ko-c	Ko-a1	3	d
<u>B2216</u>	<i>Pseudomonas</i> sp.	Cette étude	na	Ko-b4	Ko-a4	4 (12)	f (30)
B25N1	<i>Pseudomonas</i> sp.	Cette étude	na	Ko-b4	Ko-a4	4	f
D1217	<i>Pseudomonas</i> sp.	Cette étude	na	Ko-b4	Ko-a4	4	f
D42N1	<i>Pseudomonas</i> sp.	Cette étude	na	Ko-b4	Ko-a4	4	f
B12N2	<i>Pseudomonas</i> sp.	Cette étude	na	Fl-a1	Fl-a1	5 (10)	s (22)
B2217	<i>Pseudomonas</i> sp.	Cette étude	na	Fl-a1	Fl-a1	5	s
<u>D228</u>	<i>Pseudomonas</i> sp.	Cette étude	na	Fl-a1	Fl-a1	5	s
D24N1	<i>Pseudomonas</i> sp.	Cette étude	na	Fl-a1	Fl-a1	5	s
B424	<i>Pseudomonas</i> sp.	Cette étude	na	Ko-b3	Ko-a5	6 (9)	e (26)
D2220	<i>Pseudomonas</i> sp.	Cette étude	na	Ko-b3	Ko-a5	6	e
<u>D4218</u>	<i>Pseudomonas</i> sp.	Cette étude	na	Ko-b3	Ko-a5	6	e
B223	<i>Pseudomonas</i> sp.	Cette étude	na	Fl-d4	Fl-c7	7 (11)	k (24)
D428	<i>Pseudomonas</i> sp.	Cette étude	na	Fl-d4	Fl-c7	7	k
B21N2	<i>Pseudomonas</i> sp.	Cette étude	na	Co-a1	Co-b10	8 (8)	c (10)
B423	<i>Pseudomonas</i> sp.	Cette étude	na	Co-a1	Co-b10	8	c
D35N1	<i>Pseudomonas</i> sp.	Cette étude	na	Co-a1	Co-b10	8	c
<u>D424</u>	<i>Pseudomonas</i> sp.	Cette étude	na	Co-a1	Co-b10	8	c
B322	<i>Pseudomonas</i> sp.	Cette étude	na	Ma-e2	Ma-a4	9 (7)	g (7)
D229	<i>Pseudomonas</i> sp.	Cette étude	na	Ma-e4	Ma-a1	9	g
Autres	<i>Pseudomonas</i> sp.	Cette étude	na	na	na	nm/u (97)	nm/u (20)

†, la liste de références est encore incomplète et sera finalisée prochainement pour l'article. Les génotypes définis sur la base de la phylogénie des séquences partielles de *pvdA*, *pvdQ* et *gacA* sont présentés dans les colonnes du même nom. ⁽¹⁾, nom de génotype attribué sur la base des regroupements présentés Figure S1. ⁽²⁾, profil IEF de type c mais dont l'une des bandes est absente. na, non acquis. nd, non défini-pas de sidérophore produit dans les conditions expérimentales. -, pas d'amplification PCR. x, souche sans groupe taxonomique. Les souches surlignées ont été sélectionnées pour l'extraction et la purification de leur pyoverdine. *, nombre total de profil BOX-PCR du type sur les 248 isolats. °, nombre total de profils de pyoverdines du type IEF correspondant sur les 242 isolats ayant synthétisé une pvd. nm/u, non majoritaire ou unique.

3. Résultats

3.1. Développement d'une méthode moléculaire permettant de caractériser la diversité des *Pseudomonas* spp. fluorescents et des pyoverdines correspondantes à partir d'une collection de souches de référence

Le polymorphisme de séquences partielles de 3 gènes, *gacA*, *pvdQ* et *pvdA*, a été étudié pour une collection de 115 souches de références et comparé à celui de profils IEF utilisés comme marqueurs des types de pyoverdines produites (**Tableau 1**).

Huit des neuf groupes taxonomiques du complexe *P. fluorescens* décrit dans les travaux de Garrido-Sanz et al. (2016) sont représentés dans les souches de la collection étudiée (groupes *P. fluorescens*, *P. gessardii*, *P. mandelii*, *P. jessenii*, *P. koreensis*, *P. corrugata*, *P. chlororaphis* et *P. protegens*) ainsi que 5 autres groupes décrits au sein du genre *Pseudomonas* (*P. putida*, *P. syringae*, *P. lutea*, *P. aeruginosa* et *P. stutzeri*). Les espèces *P. agarici*, *P. gingeri* et *P. rhizosphaerae*, qui n'ont été rattachées à aucun groupe taxonomique dans les travaux de Gomila et al. (2015) et de Garrido-Sanz et al. (2016), sont également représentées par une souche. Des amplifications partielles de *gacA* ont été obtenues pour toutes les souches de la collection et, pour *pvdQ*, pour toutes les souches de *Pseudomonas* spp. fluorescents. En revanche, la séquence partielle de *pvdA* n'a pu être amplifiée que pour une partie des *Pseudomonas* spp. fluorescents ; les souches négatives correspondant à des pathogènes ou à des phytopathogènes. Pour chaque gène, les séquences partielles obtenues par amplification PCR ont été analysées avec d'autres séquences provenant de souches de références supplémentaires disponibles dans les banques de gènes internationales. Les trois arbres correspondants sont présentés **Figure S1** (Figure supplémentaire dans le manuscrit qui sera soumis). Pour chacun des 3 gènes étudiés, les regroupements réalisés sur la base de l'homologie des séquences permettent d'identifier clairement les groupes taxonomiques décrits au sein du genre *Pseudomonas* par Garrido-Sanz et al. (2016). Dans la grande majorité des cas, les groupes taxonomiques identifiés sont supportés par des valeurs de bootstrap élevées (67% à 100%). Des exceptions sont constituées par les souches des groupes *P. koreensis*, *P. gessardi* et *P. mandelii*. Au sein de ce dernier groupe, seules les souches appartenant à l'espèce *P. lini* forment un sous-groupe homogène supporté par de fortes valeurs de bootstrap (96% pour *gacA*, 100% pour *pvdQ*, et 98% pour *pvdA*). Les autres souches ont bien été rattachées au groupe *P. mandelii* pour *gacA* et *pvdQ* mais présentent des niveaux

Tableau 2. Distribution des types de pyoverdines identifiés sur la base de profils IEF dans différents groupes taxonomiques de *Pseudomonas* spp. fluorescents.

type de pvd des souches de références (R)	a	b	c	d	f	g	h	i	j	k	m	n	o	p	q	s	v	w	y	u		
type de pvd des isolats des pois (P)			c (8)*	d (43)*	e (9)*	f (12)*	g (7)*			k (11)*						s (10)*			t (51)*			
<i>P. corrugata</i>	R	R	R-P																	R		
<i>P. koreensis</i>			R	R-P	P	R-P															R	
<i>P. gessardii</i>			R	R																	R	R
<i>P. mandelii</i>			R			R	R-P															
<i>P. jessenii</i>									R													
<i>P. fluorescens</i>									R	R-P						R-P	P				R	R
<i>P. syringae</i>									R													
<i>P. protegens</i>														R								
<i>P. chlororaphis</i>											R	R										
<i>P. aeruginosa</i>													R									R
<i>P. putida</i>															R			R				R

* : Nombre d'isolats dont le génotype a été déterminé sur la base du polymorphisme de *gacA* et *pvdQ*. Les types l et r n'ont pas été assignés. Le profil u représente des profils uniques

d'identité plus faibles entre-elles et avec les souches du sous-groupe *P. lini*. Les souches du groupe *P. koreensis* ont été regroupées par les séquences des 3 gènes mais ces regroupements ne sont supportés par de fortes valeurs de bootstrap que pour *pvdQ* et *pvdA* (respectivement 92% et 93%). Les souches du groupe *P. gessardii* ont également été regroupées mais dans deux ensembles différents qui sont, eux, soutenus par de fortes valeurs de bootstrap. Les souches types de *P. agarici*, *P. gingeri* ont été associées dans un même groupe fortement supporté par les valeurs de bootstrap pour *pvdQ* (100%) et *gacA* (88%). Les séquences présentant le plus d'homologie avec la séquence partielle de *gacA* de *P. rhizosphaerae*, souche non fluorescente, étaient celles des souches du groupe *P. lutea*, également proches dans les phylogénies présentées par Gomila et al (2015) et Garrido-Sanz et al. (2016). En conclusion, les séquences des gènes *gacA* et *pvdQ*, ont permis d'obtenir des résultats pour la majorité des souches de référence de *Pseudomonas* (*gacA*) ou de *Pseudomonas* spp. fluorescents (*pvdQ*) étudiées et de les replacer dans les groupes taxonomiques définis pour ce genre par Gomila et al. (2015) et Garrido-Sanz et al. (2016). En revanche, en raison du nombre important de souches pour lesquelles la séquence *pvdA* n'a pas pu être amplifiée, ce gène n'a pas été conservé comme marqueur potentiel de diversité dans la suite de l'étude.

Les résultats du typage des pyoverdines sur la base des profils d'isoélectrofocalisation (IEF) sont présentés dans le **Tableau 1**. Différents profils IEF sont présentés en exemple Annexe 2. A l'exception de 10 souches pour lesquelles la production de pyoverdine a été trop faible ou nulle dans nos conditions expérimentales (noté « nd » dans le **Tableau 1**), un profil IEF a été obtenu pour toutes les souches de *Pseudomonas* spp. fluorescents de la collection de référence. Les résultats de la caractérisation des pvd par profils IEF sont présentés **Figure S1** et dans le **Tableau 1**. Vingt-sept profils IEF différents ont été décrits pour les souches de référence. Huit de ces profils n'ont été observés que pour une seule souche (uniques).

Une correspondance est observée entre les regroupements des souches faits sur la base de l'analyse des séquences des gènes *gacA* et *pvdQ* et ceux basés sur les profils IEF et utilisés comme indicateurs des types de pyoverdines produites (**Figure S1, Tableau 2**). Pour les souches de 3 des groupes taxonomiques, *P. jessenii*, *P. protegens* et *P. syringae*, un seul type IEF a été décrit, respectivement les types h, p et j. Ces types de pvd n'ont été décrits dans aucun des autres groupes taxonomiques (**Tableau 2**). Dans les autres groupes taxonomiques, plusieurs types de pvd ont été décrits (**Tableau 2**). On remarque cependant que certains types

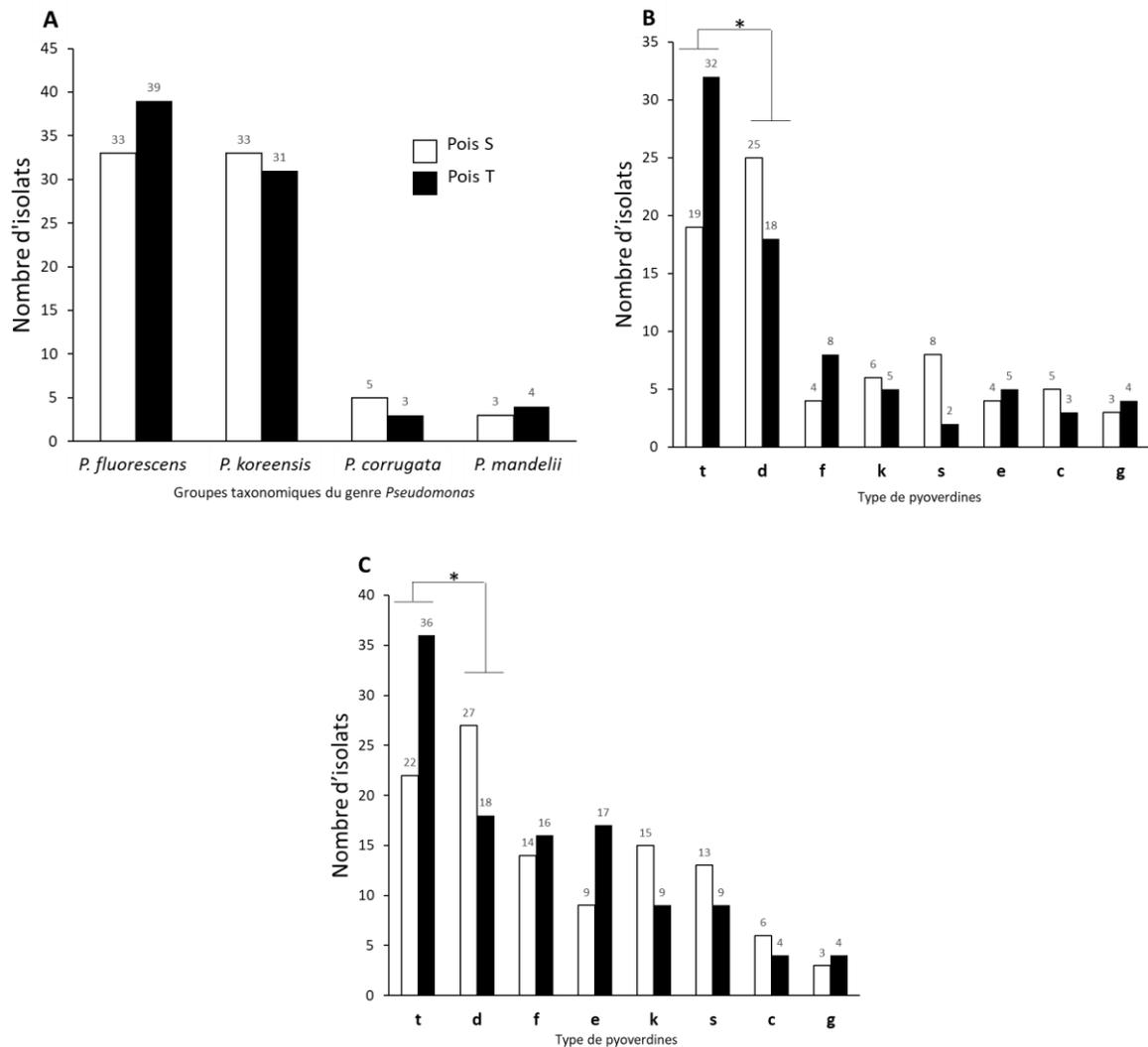


Figure 1. Comparaison des distributions des *Pseudomonas* spp. fluorescents isolés de la rhizosphère de deux cultivars de pois, S, sensible, et T, tolérant à la chlorose ferrique sur la base de caractéristiques taxonomiques et fonctionnelles. **(A)**, Distribution des isolats appartenant aux 10 génotypes *gacA* majoritaires dans les groupes taxonomiques de *Pseudomonas* correspondants. **(B)**, Distribution des isolats appartenant aux 10 génotypes *gacA* majoritaires dans les 8 types de pyoverdines correspondants. **(C)**, Distribution de tous les isolats produisant une des 8 pyoverdines majoritaires dans les types de pvd correspondants. Les types de pyoverdines ont été définis sur la base de profils IEF. Les distributions ont été comparées en utilisant le test exact de Fisher en présence d'effectifs inférieurs à 5 et le test du Chi-deux de Pearson dans les autres cas. *, $p < 0.05$.

de pvd sont spécifiques d'un groupe taxonomique (**Tableau 2, colonnes blanches**), alors que d'autres ont été décrits pour des souches appartenant à des groupes taxonomiques différents (**Tableau 2, colonnes grises**). A l'exception des souches de *P. aeruginosa*, les souches dont les séquences *gacA* et *pvdQ* présentent de fortes identités (respectivement $\geq 98\%$ et $>97,5\%$) et dont le regroupement est supporté par de fortes valeurs de bootstrap (de 99% à 100 %) produisent les mêmes types de pvd (**Figure S1**).

3.2. Etude de la diversité des *Pseudomonas* spp. fluorescents isolés de deux cultivars de pois S et T et des pyoverdines correspondantes

Une analyse de profils BOX-PCR a été réalisée en amont de celle du polymorphisme des gènes *gacA* et *pvdQ*. L'objectif était d'identifier les bactéries présentant un fond génétique similaire afin (i) d'étudier des groupes d'isolats dont la représentation était d'au moins 2,5% de la totalité (comprenant au moins 7 individus) et (ii) de limiter l'étude des groupes à celle d'isolats représentatifs. Cette analyse a placé 151 des 248 isolats (61%) provenant des pois S et T dans 9 groupes comprenant chacun de 7 à 51 isolats. Le polymorphisme des séquences partielles de *gacA* et *pvdQ* a été étudié sur 39 isolats représentatifs de ces groupes (**Tableau 1**). Dix génotypes ont été décrits à partir des regroupements réalisés sur la base de l'homologie des séquences *gacA* (Fl-a1, Fl-c7, Fl-c9, Ko-a1, Ko-a3, Ko-a4, Ko-a5, Co-b10, Ma-a1, Ma-a4) (**Figure S1** et **Tableau 1**). Des regroupements faits à partir de l'analyse des séquences *pvdQ* ont donné des résultats identiques (**Figure S1** et **Tableau 1**). Le nom des génotypes *gacA* a été utilisé dans la suite de l'étude. Les bactéries des 10 génotypes décrits appartiennent toutes au complexe *P. fluorescens* (**Figure S1**). Les isolats présentant les génotypes : (i) Fl-a1, Fl-c7, Fl-c9, ont été regroupés avec les souches du groupe *P. fluorescens*, (ii) Ko-a1, Ko-a3, Ko-a4, Ko-a5, ont été regroupés avec les souches du groupe *P. koreensis*, (iii) Co-b10, ont été regroupés avec les souches du groupe *P. corrugata*, et (iv) Ma-a1, Ma-a4, ont été regroupés avec les souches formant le sous-groupe *P. lini* au sein du groupe *P. mandelii*. La distribution des isolats des deux pois S et T appartenant aux 10 génotypes les plus représentés au sein des 4 groupes taxonomiques auxquels ils ont été rattachés, *P. fluorescens*, *P. koreensis*, *P. corrugata* et *P. mandelii*, est présentée **Figure 1A**. Aucune différence de répartition dans les groupes taxonomiques n'a été observé entre les isolats des deux pois (Test exact de Fisher, $p= 0,772$).

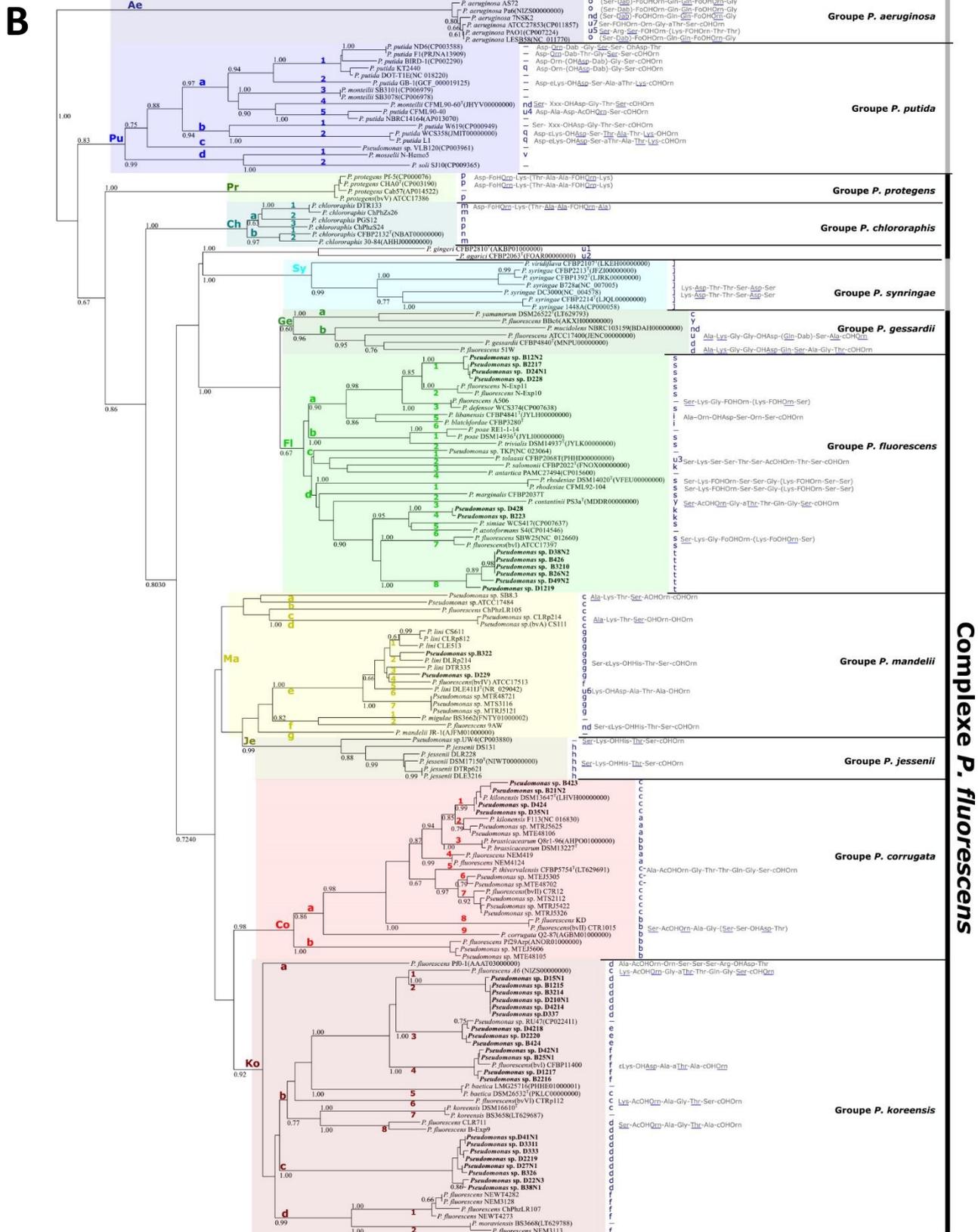
Le polymorphisme des pyoverdines produites par les isolats appartenant aux dix génotypes les plus représentés au sein des isolats de pois a été étudié sur la base de leurs profils IEF. Huit profils IEF (c, d, e, f, g, k, s, t) ont été observés. Six de ces 8 profils (c, d, f, g, k, s) ont été également obtenus pour des souches de référence de la collection étudiée. Les profils, 'e' et 't', n'ont été décrits que pour des isolats de pois. La distribution des isolats des deux pois S et T appartenant aux dix génotypes décrits dans ces huit types de pyoverdines est présentée **Figure 1B**. Les huit types de pvd sont représentés chez les isolats des deux pois. Toutefois, la distribution des deux pvd dominantes, t et d, varie significativement entre les pois S et T (**Figure 1B**). La pvd t est la plus représentée parmi les isolats issus du pois T alors que la pvd d est la plus représentée parmi les isolats issus du pois S. Cette différence a été maintenue lorsque l'étude du polymorphisme des pvd a été étendue à l'ensemble des 248 isolats de pois (**Figure 1C**). Au total, 222 des 248 (88%) isolats provenant des pois S et T produisaient l'une des 8 pyoverdines préalablement décrites ; la pvd t étant produite par 29% des isolats du pois T et la pvd d par 21% des isolats du pois S. Onze autres types de pvd, non observés au préalable pour les souches de référence, ont été obtenus pour 20 des 26 isolats restants. Ces pyoverdines n'étaient produites que par 1 à 4 souches. Aucun profil IEF n'a été obtenu pour les 6 derniers isolats.

Chacun des 10 génotypes dominants de *Pseudomonas* spp. fluorescents, initialement définis par l'analyse des séquences partielles de *gacA* et *pvdQ*, a regroupé des isolats produisant tous le même type de pvd ; ce type correspondant à l'une des 8 pyoverdines majoritaires. Les génotypes Fl-c9, Ko-a4, Fl-a1, Ko-a5, Fl-c7 et Co-b10 produisent respectivement les pvd t, f, s, e, k, et c. Les génotypes Ko-a3 et Ko-a1 produisent le même type de pyoverdine, d (**Tableau 1**). De même, les génotypes Ma-a1 et Ma-a4 produisent, le même type de pyoverdine, g (**Tableau 1**). Ainsi, comme observé pour les souches de référence, les souches regroupées sur la base de séquences dont l'identité est supérieure ou égale à 98% pour *gacA* et à 99,2% pour *pvdQ* produisent toutes un même type de pvd (**Figure S1**). Les isolats de pois de cinq de ces 10 génotypes dominants étaient regroupés avec une ou plusieurs souches de référence pour lesquelles un type de pvd a été décrit: (i) les isolats du génotype Co-b10 ont été regroupés avec la souche type de *P. kilonensis* CFBP5372^T, et tous produisent la pvd de type c, (ii) les isolats du génotype Ko-a4 ont été regroupés avec la souche CFBP11400 de *P. fluorescens*, et tous produisent la pvd de type f, (iii) les isolats du génotype Ma-a1 et

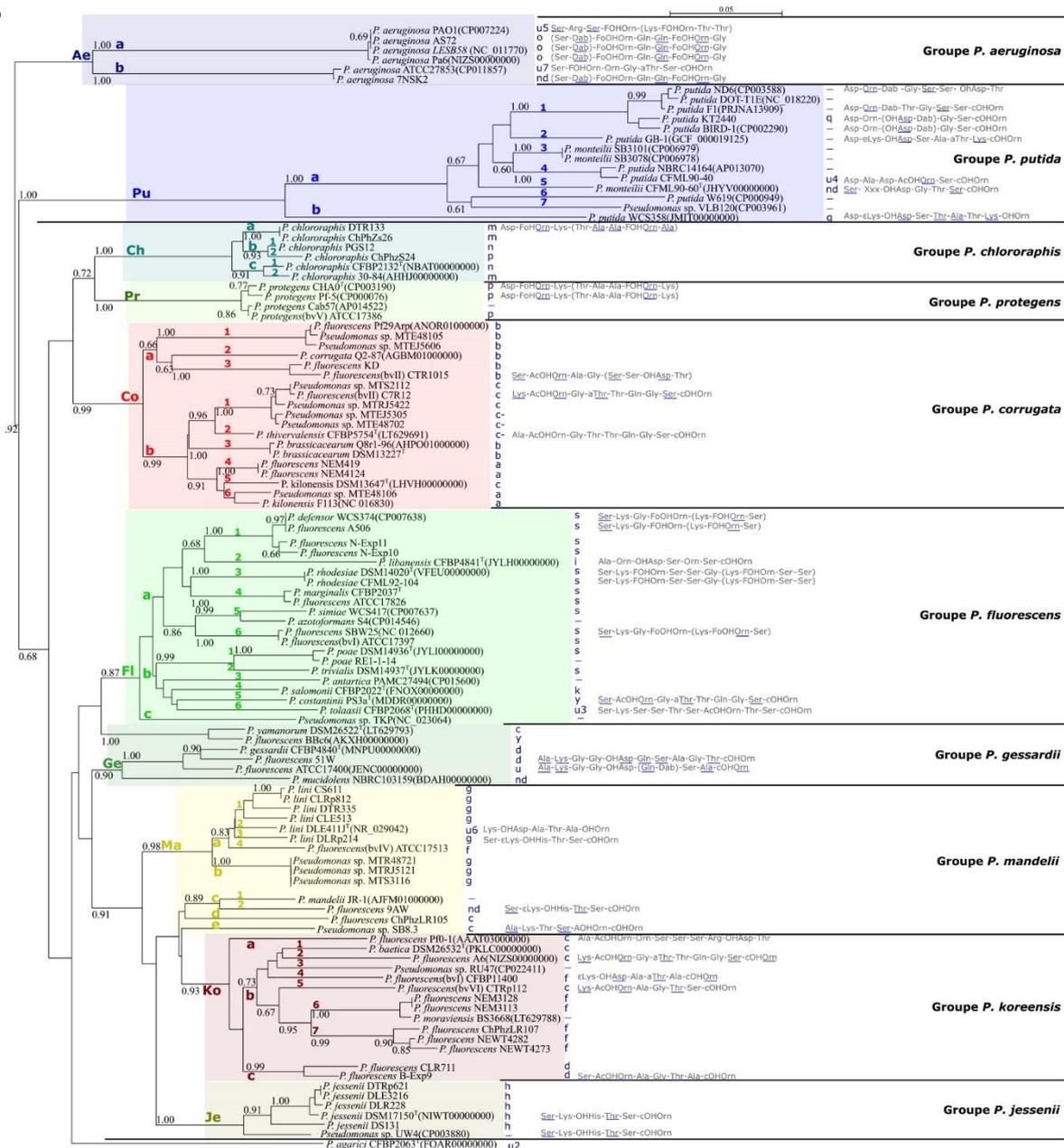
Ma-a4 ont été regroupés avec des souches de *P. lini* (respectivement MTRJ5121 et DLRp214), et tous produisent la pvd de type g, (iv) les isolats du génotype Fl-a1 ont été regroupés avec la souche type de *P. defensor* WCS374^T, et tous produisent la pvd de type s.

Figure S1. Arbres phylogénétiques construits avec la méthode NJ (Neighbour joining) à partir de distances génétiques calculées selon le modèle de Kimura à deux paramètres. **(A)**, arbre construit sur la base de 177 séquences *gacA* et enraciné sur une séquence provenant d'*E. coli*. **(B)**, arbre construit sur la base des 171 séquences *pvdQ* et enraciné sur les séquences provenant du groupe *P. aeruginosa*. **(C)**, arbre construit sur la base des 115 séquences *pvdA* et enraciné sur les séquences provenant du groupe *P. aeruginosa*. En bleu : profils IEF des pyoverdines associées à chaque souche et groupes d'espèces définis selon Garrido-Sanz et al. (2016). -, aucune caractérisation du profil IEF n'a été effectuée. nd, aucun profil IEF n'a été obtenu. Seules les valeurs de bootstrap (1000 répliques) supérieures à 50% (0.50) ont été affichées. †, indique les souches types. Les noms en gras indiquent les isolats des pois S et T. Lorsqu'elle a été étudiée, la composition de la chaîne peptidique de la pyoverdine est présentée en gris à droite du profil IEF de la souche correspondante.

Chapitre II : Impact du génotype de pois sur les communautés bactériennes, les *Pseudomonas* spp. fluorescents et les pyoverdines associées



C



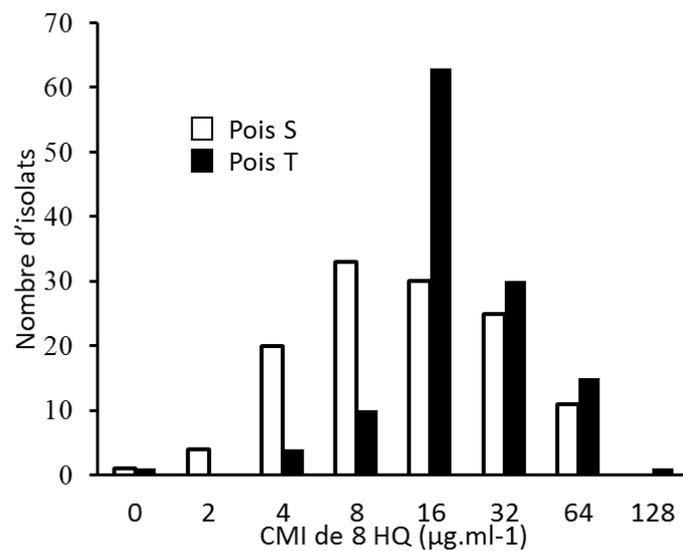


Figure 2. Distribution des isolats de *Pseudomonas* spp. fluorescents isolés de la rhizosphère des cultivars de pois S et T selon leur CMI de 8-hydroxyquinoline (molécule complexant le fer et limitant sa disponibilité proportionnellement à sa concentration). Les deux distributions sont significativement différentes selon une comparaison faite sur la base d'un test exact de Fisher ($p = 8,078 \cdot 10^{-8}$).

3.3. Comparaison de la sensibilité au stress ferrique des *Pseudomonas* isolés de la rhizosphère des cultivars de pois S et T

La concentration minimale inhibitrice (CMI) de 8-hydroxyquinoline (8HQ) a été étudiée pour les 248 isolats des deux cultivars de pois. La distribution des isolats de pois en fonction de leur CMI de 8HQ varie significativement selon le cultivar d'origine (**Figure 2**). Collectivement, les isolats du cultivar T de pois, tolérant à la chlorose ferrique, sont plus aptes à se développer dans des conditions de disponibilité en fer limitée par la présence de 8HQ que ceux du cultivar S, sensible à la chlorose ferrique. La différence la plus importante a été observée pour la classe de CMI de $16 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ pour laquelle la fréquence des isolats est bien plus élevée pour T (51%) que pour S (24%).

3.4. Comparaison de la diversité des communautés de *Pseudomonas* spp. fluorescents de la rhizosphère des pois S et T et des sidérophores correspondants

Les résultats du séquençage sont en cours de traitement. Ils seront décrits et comparés aux résultats obtenus pour les souches cultivables isolées de la rhizosphère. Cette partie ainsi qu'une partie de discussion correspondante seront intégrées au manuscrit qui sera soumis.

3.5. Comparaison de la diversité des communautés bactériennes totales de la rhizosphère des cultivars de pois S et T

Globalement, la diversité bactérienne alpha a été évaluée selon trois indices de diversité couramment utilisés : Observed, Chao1, et ACE. La différence entre les cultivars de pois S et T évaluée, n'est pas significative au seuil de 5% (Observed $p=0,1603$; Chao1 $p=0,1152$ et ACE $p=0,0988$). Néanmoins une tendance indiquant que la diversité du microbiote associée au cultivar T pourrait être plus importante que celle associée au génotype S a pu être observée sur la base de l'indice ACE.

L'analyse des communautés totales bactériennes n'a globalement pas montré de différences significatives entre les pois S et T, excepté pour la famille des Oxalobacteraceae (appartenant aux Burkholderiales au sein des bêta-proteobactéries) plus abondante chez S ($p\text{-value} < 5\%$) et celle des Xanthomonadaceae (appartenant aux Xanthomonadales chez les gamma-protéobactéries) plus abondante chez T ($p\text{-value} < 10\%$).

Tableau 3. Protection des cultivars de pois S et T contre la pourriture racinaire par inoculation d'isolats de *Pseudomonas* spp. fluorescents caractérisés par leur génotype *gacA* et le type de pyoverdines (pvd) produite, et activité antagoniste des pyoverdines (pvd) purifiées à l'encontre de l'agent de la maladie *A. euteiches*. Les types de pyoverdines ont été définis sur la base de profils IEF. L'antagonisme a été évalué en boîte de Pétri par l'aire en cm² de la zone d'inhibition de croissance du pathogène autour d'un dépôt de pyoverdine (65 nmoles). La protection contre la maladie a été évaluée par la mortalité de plantes cultivées *in vitro* 18 et 21 jours (18J, 21J) après inoculation du pathogène et par l'aire sous la courbe de progression de la maladie 21 jours après inoculation du pathogène ou AUDPC 21J (Area Under the Disease Progress Curve).

Isolats	pvd	génotypes <i>gacA</i>	Pvd antagonisme (cm ²)	Pois S			Pois T		
				Mortalité 18J	Mortalité 21J	AUDPC 21J	Mortalité 18J	Mortalité 21J	AUDPC 21J
témoins sans bactérie/pvd			0	71%	86%	72± 24	44%	56%	73± 36
B426	t	Fl-c9	1.8 (cd)	0%	30%	68± 20	30%	60%	72± 36
D4214	d	Ko-a3	1.9 (bcd)	22%	33%	73± 21	0%	13%	74± 16
B326	d	Ko-a1	2.1 (bcd)	13%	25%	59± 25	38%	38%	76± 29
B2216	f	Ko-a4	3 (ab)	22%	22%	72± 18	14%	14%	73± 20
D228	s	Fl-ca1	2.8 (abc)	63%	63%	72± 28	13%	50%	63± 21
D4218	e	Ko-a5	2 (bcd)	29%	71%	76± 24	33%	33%	66± 35
D424	c	Co-a10	1.1 (d)	38%	38%	72± 21	0%	14%	57± 22
C7R12	c	Co-b4	3.4 (a)	33%	89%	76± 17	22%	56%	75± 20

AUDPC calculée à partir d'une notation selon Wicker et al. (2001).

Code couleur pour la mortalité : 0%, 1-25%, 26-50%, 51-75%, 76-100%.

B et D au début du nom d'isolat indiquent respectivement un isolement des pois T et S.

Des lettres différentes entre parenthèses indiquent une différence significative mise en évidence par une ANOVA suivie du test post-hoc LSD de Fisher avec une correction de Bonferroni.

3.6. **Activité antagoniste des pyoverdines à l'encontre de l'agent de la pourriture racinaire (*Aphanomyces euteiches*) et protection des cultivars de pois S et T contre la maladie par les souches qui les produisent**

Sept pyoverdines purifiées à partir de cultures de souches de *Pseudomonas* spp. fluorescents fréquemment représentées dans la rhizosphère des pois S et T et la pyoverdine d'une souche de référence, *P. fluorescens* C7R12, ont été testées pour leur activité antagoniste à l'encontre d'*A. euteiches*. Six types de pyoverdine différents étaient représentés pour les huit pvds étudiées (c, d, e, f, s, t). Les résultats sont présentés dans le **Tableau 3**. Toutes les pyoverdines ont eu un effet antagoniste à l'encontre de l'oomycète phytopathogène. Dans tous les cas, leur activité a été inhibée en présence de fer. L'antagonisme observé était donc bien associé à la compétition pour le fer (**Figure S2**). La pvd de type c de la souche modèle C7R12 présentait la plus forte activité antagoniste. Pour les isolats du pois, la pvd f de la souche B2216 avait la plus forte activité, la différenciant significativement de celle de la pvd t produite par B426 et c produite par D424.

Les 7 isolats de pois et la souche modèle *P. fluorescens* C7R12, produisant les 8 pyoverdines étudiées pour leur activité antagoniste à l'encontre d'*A. euteiches*, ont été testés pour leur aptitude à protéger les pois S et T contre la pourriture racinaire provoquée par cet agent pathogène. Les valeurs d'AUDPC, présentant une grande variabilité, n'ont pas permis de mettre en évidence de différences significatives entre les traitements (**Tableau 3**). Bien que la mortalité des plantes ait aussi présenté beaucoup de variabilité, des résultats intéressants peuvent être notés. En l'absence de traitement, pour le pois S, les pourcentages de plantes mortes après 18 et 21 jours, 71% et 86%, ne sont pas significativement différents du niveau théorique de 100% correspondant à une mortalité totale des plantes (test exact de Fisher ; $p=0.46$ et $p=1$). A l'inverse, pour le pois T, le pourcentage de plantes mortes après 18 jours, 44% est significativement différent du niveau théorique de 100% de plantes mortes (test exact de Fisher ; $p=0.0029$).

La variabilité des résultats ne permet pas de conclure à des différences significatives dans la protection assurée par les souches. Cependant, pour les deux cultivars de pois, le taux de mortalité le plus élevé après 21 jours, dans les deux cas identiques à celui du témoin non traité, a été observé en présence de la souche modèle C7R12.

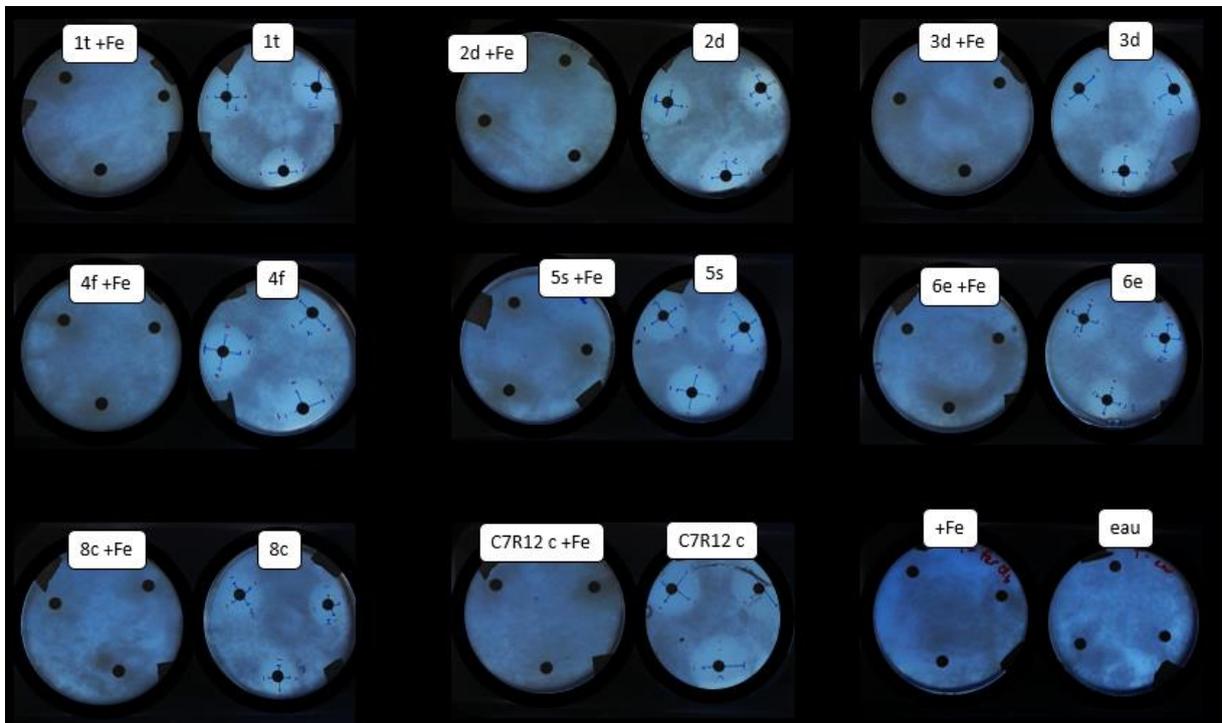


Figure S2. Antagonisme *in vitro* de différents types de pyoverdines à l'encontre d'*A. euteiches* en présence ou non de fer. L'aire des zones circulaires d'inhibition de la croissance du mycélium de l'oomycète, visibles en clair autour des disques de papier filtre imprégnés de pvd ou d'eau (témoin) apparaissant en noir, a été évaluée en mesurant 4 rayons (visualisés par des traits pour l'exemple). Le type de pvd (c, d, f, e, s, ou t) est précédé du numéro correspondant au type BOX-PCR de la souche à partir de laquelle la pvd a été purifiée. +Fe, présence de fer dans le milieu de culture. La pyoverdine de la souche modèle *P. fluorescens* C7R12 produisant une pyoverdine de type « c » a aussi été testé.

4. Discussion

4.1. Développement d'une méthode moléculaire de caractérisation de la diversité des *Pseudomonas* spp. fluorescents et des pyoverdines correspondantes

Afin d'identifier des gènes marqueurs de la diversité des *Pseudomonas* spp. fluorescents et des pyoverdines produites par ces bactéries, le polymorphisme de séquences partielles de 3 gènes, *gacA*, un régulateur global de transcription, ainsi que *pvdQ* et *pvdA*, deux gènes impliqués directement dans la synthèse des pyoverdines, a été étudié pour une collection de souches de référence. Le polymorphisme a été comparé à celui de profils IEF utilisés comme marqueurs des types de pyoverdines produites par les souches correspondantes. L'analyse de la diversité de *Pseudomonas* spp. fluorescents isolés de la rhizosphère de deux cultivars de pois, l'un sensible, S, et l'autre tolérant, T, à la chlorose ferrique, et des pyoverdines produites par ces isolats a contribué à évaluer l'intérêt de l'utilisation des séquences choisies comme marqueurs.

Pour les 3 gènes étudiés, l'analyse des séquences a permis d'identifier clairement les groupes taxonomiques du genre *Pseudomonas* auxquels appartiennent les souches de référence et décrits précédemment sur la base de la concaténation de séquences de plusieurs gènes de ménage (16S rRNA, *gyrB*, *rpoB* et *rpoD*) (Gomila et al., 2015; Garrido-Sanz et al., 2016). Les gènes *gacA* et *pvdQ* sont apparus comme de bons marqueurs de la diversité taxonomique des *Pseudomonas* spp. fluorescents. Le gène *gacA* présente l'avantage de permettre également l'identification de souches d'espèces non fluorescentes. Si *pvdQ* a permis d'identifier la quasi-totalité des souches du groupe des *Pseudomonas* spp. fluorescents, en revanche *pvdA* n'a pas été amplifié pour plusieurs d'entre elles dont les souches du groupe *P. syringae*. Le défaut d'amplification était attendu puisque les pyoverdines qui ont été décrites pour ce groupe (*P. syringae*, *P. virioidiflava*, *P. cichorii*) ne comportent pas d'ornithine (Jülich et al., 2001; Bultreys et al., 2003). D'autres pathogènes (*P. blatchfordae*, *P. gingeri*) se trouvent aussi parmi les souches pour lesquelles *pvdA* n'a pas pu être amplifié. D'autres souches encore sont des pathogènes opportunistes de l'Homme (*P. mosselii*) (Mazurier et al., 2015).

La comparaison du polymorphisme de *gacA* et *pvdQ* à celui des types de profils IEF des *pvd* produites par les souches de référence a montré que les séquences partielles des deux gènes peuvent permettre d'identifier les pyoverdines produites par des souches inconnues.

C'est le cas pour les souches appartenant à des groupes ou sous-groupes taxonomiques pour lesquels un seul type spécifique de pvd a été décrit comme *P. syringae*, *P. jessenii*, et les souches de l'espèce *P. protegens*. C'est également le cas, au sein du complexe *P. fluorescens* : les souches formant des sous-groupes, définis sur la base d'un fort niveau d'identité de séquences, produisent un même type de sidérophore. En accord avec ces résultats, les pyoverdines dont la structure a été décrite dans la littérature pour les souches du groupe *P. syringae* sont toutes identiques ou très proches (Jülich et al., 2001). Dans ce groupe, seule la chaîne peptidique de la pvd des souches de *P. cichorii* diffère. Néanmoins cette différence ne porte que sur un acide aminé ; une glycine se substituant à la sérine présente pour les souches des autres espèces du groupe (Bultreys et al., 2003). De même, les souches de *P. jessenii* étudiées antérieurement appartenaient toutes à un même sidérovar, défini par un même profil d'IEF et la capacité à incorporer les mêmes sidérophores hétérologues (Meyer et al., 2002). L'existence de sous-groupes de souches très proches pour les séquences étudiées et produisant le même type d'IEF au sein de groupes taxonomiques dans lesquels une grande diversité est décrite (*P. fluorescens*, *P. corrugata*, *P. mandelii*, *P. koreensis*) est en accord avec l'observation de correspondances entre taxonomie et sidérovars qui avait conduit certains auteurs à proposer le siderotypage, comme outil d'identification taxonomique (Fuchs et al., 2001; Meyer et al., 2007). En revanche, l'observation de types de pvd communs à des souches différenciées sur la base de leur génome entier appartenant à un même groupe taxonomique (ex : pvd 's' pour *P. defensor* WCS374, *P. fluorescens* SBW25 et *P. simiae* WCS417) et la description de pvd identiques dans des groupes taxonomiques différents (pvd c, d, f et y) sont des éléments qui vont à l'encontre de cette proposition. L'utilisation des profils IEF comme indicateur de la structure des pvd présente des limites. C'est une technique moins résolutive qu'une analyse en spectrométrie de masse et des pvd différentes peuvent être donc regroupées par leurs profils IEF. Néanmoins, il a été montré par ailleurs que WCS374, SBW25 et WCS417 partagent bien une pyoverdine de structure très proche (Berendsen et al., 2015). De même, les pyoverdines de type 'c' des souches A6 et C7R12, appartenant à des groupes taxonomiques différents, partagent bien une même structure (Meyer et al., 2007; Laurent Ouerdane communication personnelle). Ces résultats confortent nos observations qui montrent que les souches d'un même groupe taxonomique partagent un ensemble de types de pvd et que certains types de pvd semblent pouvoir être retrouvés dans différents groupes taxonomiques. Ce schéma pourrait apporter un complément à la théorie majoritairement

rapportée selon laquelle la grande variabilité de la chaîne peptidique des pyoverdines, facilement modifiée du fait d'une synthèse assurée par des NRPS, serait principalement destinée à éviter une récupération par des microorganismes dits tricheurs. Les incongruences entre la phylogénie et les pyoverdines produites suggèrent plutôt l'existence de transferts horizontaux permettant une adaptation à un environnement particulier. Cette idée est en accord avec les travaux de Smith et al., (2005) qui avaient montré que les gènes de synthèse de la pyoverdine ne sont pas compris dans le core génome des *Pseudomonas* spp. fluorescents et seraient donc associés à des fonctions adaptatives. La chaîne peptidique des pvd pourrait avoir une fonction autre que permettre une récupération spécifique des ferripyoverdines par les souches ayant synthétisé les pvd correspondantes. Les travaux de Jülich et al. (2001) sur la pyoverdine des souches de *P. syringae* sont en accord avec cette hypothèse. Ces auteurs ont montré que cette pvd ne comporte pas d'ornithine et que les deux sites de ligation du fer de la chaîne peptidique sont situés au niveau d'acides aspartiques (OHAsp). D'après Jülich et al. (2001) cette structure particulière, qui confère à la pyoverdine des souches de *P. syringae* une forte affinité pour le fer à pH 5, pourrait constituer un avantage pour les souches la produisant dans des environnements acides. L'absence d'amplification de *pvdA* pour d'autres pathogènes n'appartenant pas au groupe *P. syringae* mise en évidence dans la présente étude suggère aussi une absence d'ornithine dans ces pvd. Il serait intéressant d'étudier leur structure afin de savoir si les acides aminés de liaison avec le fer pourraient aussi leur conférer un avantage dans un milieu à pH particulier.

Globalement, en utilisant *gacA* et/ou *pvdQ* comme marqueur, l'identification du type de pvd potentiellement produit pour une souche inconnue va dépendre (i) de son appartenance à certains groupes taxonomiques spécifiques ou (ii) de la présence parmi les références de souches ayant un type pvd connu et partageant une forte identité avec elle. Dans l'étude de la diversité des isolats du pois, cette situation a été retrouvée pour 5 des 10 génotypes dominants étudiés (Fl-a1, Ko-a4, Co-b10, Ma-a1 et Ma-a4). Pour les 5 autres génotypes, il a néanmoins été possible de déduire des analyses des séquences de *gacA* et *pvdQ* que les isolats y étant rattachés produisaient un même type de pvd. De plus, l'analyse des types IEF des isolats correspondants a permis d'enrichir le panel des références et, en particulier, de décrire deux nouveaux types de pvd (e, t) produits par les isolats du pois rattachés aux groupes *P. koreensis* et *P. fluorescens*. Si la description de la diversité des pvd avec *gacA* ou *pvdQ* dépend

des références disponibles, en revanche, on peut envisager d'utiliser ces gènes, et en particulier *pvdQ* qui présente plus de polymorphisme que *gacA*, pour construire des amorces spécifiques. La présence et l'abondance de groupes de souches produisant des pyoverdines particulières pourraient donc être étudiées par PCR quantitative avec ce marqueur.

4.2. Comparaison de la diversité des *Pseudomonas* spp. fluorescents isolés des deux cultivars de pois S et T et des pyoverdines correspondantes

L'utilisation de *gacA* et de *pvdQ* a permis d'obtenir les mêmes résultats dans la description de la diversité taxonomique et fonctionnelle (*pvd*) des génotypes majoritaires des isolats du pois représentant 61% de la totalité des bactéries isolées. Tous ces isolats, regroupés en 10 génotypes dominants, appartenaient au complexe *P. fluorescens*. Ils appartenaient en majorité et en proportions comparables aux groupes *P. fluorescens* (48%) et *P. koreensis* (42%). Aucune différence n'a été observée dans la représentation globale des isolats de *P. fluorescens* et *P. koreensis* selon qu'ils aient été isolés du pois sensible (S) ou tolérant (T) à la chlorose ferrique. Le même génotype (FI-c9), appartenant au groupe *P. fluorescens*, est dominant pour les isolats des 2 pois avec une représentation plus importante pour les isolats du pois T (25%) que pour les isolats du pois S (15%). Ce génotype forme un groupe homogène n'incluant aucune des références utilisées. Parmi les souches de référence les plus proches on trouve *P. fluorescens* SBW25 et *P. simiae* WCS417. Globalement, la comparaison des isolats des 2 pois au niveau des groupes taxonomiques décrits pour le genre *Pseudomonas* n'a pas permis d'observer de différences importantes.

En revanche, la comparaison des types de sidérophores produits a permis de mettre en évidence des dominances différentes chez les deux pois. Le type t de *pvd* domine pour le pois T alors que c'est le type d qui domine pour le pois S.

4.3. Comparaison de la sensibilité au stress ferrique des *Pseudomonas* isolés de la rhizosphère des cultivars de pois S et T

L'évaluation des CMI de 8HQ pour les isolats des 2 cultivars de pois a permis de mettre en évidence une capacité globale à résister à une carence en fer plus importante pour les bactéries associées au pois tolérant à la chlorose ferrique que pour celles associées au pois sensible. Des travaux antérieurs ont montré, par la même méthode, que les *Pseudomonas* associés aux racines d'un tabac transgénique surexpresser de ferritine résistaient globalement mieux à la carence en fer que ceux associés à la plante sauvage prélevant moins de fer dans la rhizosphère que le transgène (Robin et al., 2007). La similitude observée entre les résultats obtenus avec les 2 cultivars de pois et avec les deux génotypes de tabac conforte l'hypothèse selon laquelle la capacité à acquérir le fer d'une plante tolérante serait plus élevée que celle d'une plante sensible à la carence en fer. Cependant aucune correspondance globale n'a été identifiée entre les CMI de 8HQ et l'identité taxonomique des isolats ou encore, le type de pvd produit (résultats non présentés). Différents facteurs peuvent expliquer cette situation. Une plus grande capacité des bactéries à résister à la carence en fer n'est pas nécessairement liée à leur capacité à acquérir le fer et donc à la production de sidérophores. Les besoins en fer de leur métabolisme peuvent varier (Neilands, 2014; Chandransu et al., 2017). De plus, la quantité de sidérophores produits peut varier selon les bactéries (Ponraj et al., 2012). La pyoverdine n'est pas le seul sidérophore produit par les *Pseudomonas* spp. fluorescents. Ils produisent des sidérophores secondaires (Cornelis, 2010; Matthijs et al., 2016). Enfin, d'autres molécules produites par ces bactéries ont aussi une activité de sidérophore comme par exemple l'acide salicylique, les phénazines ou des acides organiques.

4.4. Comparaison de la diversité des communautés de *Pseudomonas* spp. fluorescents de la rhizosphère des pois S et T et des sidérophores correspondants

Discussion des résultats actuellement en cours d'exploitation devant être incluse dans le manuscrit à soumettre et concernant en particulier: (i) la comparaison avec les résultats obtenus pour les souches isolées, et (ii) le niveau d'exploitation possible en fonction des références dont on dispose.

4.5. Comparaison de la diversité des communautés bactériennes totales de la rhizosphère des cultivars de pois S et T

La comparaison des communautés bactériennes totales associées aux racines des 2 cultivars de pois a mis en évidence une diversité plus importante pour le pois tolérant et une présence accrue des Xanthomonadaceae alors que les Oxalobacteraceae étaient plus abondantes pour le pois sensible. Bien que faibles et à la limite des seuils de signification, ces différences indiquent qu'en plus des *Pseudomonas*, d'autres composantes du microbiote des deux pois diffèrent. Ces deux grandes familles ont toutes deux été retrouvées dans de nombreuses études concernant le microbiote de la rhizosphère. La famille des Xanthomonadaceae est étudiée pour des espèces phytopathogènes comme certains *Xanthomonas* ou *Stenotrophomonas*, cependant d'autres espèces non pathogènes sont aussi associées aux plantes (Bansal et al., 2019). Certaines bactéries du genre *Stenotrophomonas* seraient impliquées dans la production de composés volatiles antifongiques (Zou et al., 2007). Il a également été montré que les Oxalobacteraceae sont retrouvées en association avec de nombreuses espèces de plantes. Certaines espèces sont capables d'améliorer la croissance des plantes via la production de sidérophores ou encore d'hormones (Baldani et al., 2014). Les bactéries de cette famille sont aussi associées aux mycorrhizes (Offre et al., 2008). Pour les *Pseudomonas*, c'est sur la base de critères fonctionnels (type de pvd et résistance à la carence en fer) que des différences ont été mises en évidence entre les isolats des deux cultivars de pois. Les faibles différences enregistrées sur des critères taxonomiques pour les autres composantes du microbiote pourraient donc aussi correspondre à des différences fonctionnelles plus importantes.

4.6. Activité antagoniste de pyoverdines à l'encontre de l'agent de la pourriture racinaire (*Aphanomyces euteiches*) et protection des cultivars de pois S et T contre la maladie par les souches qui les produisent

Les 8 pvd purifiées testées ont toutes exercé une activité antagoniste liée à la compétition pour le fer à l'encontre d'*A. euteiches*. Les *Pseudomonas* présents en majorité dans la rhizosphère des 2 pois sont donc potentiellement tous capables de limiter la croissance saprophyte d'un phytopathogène en limitant la disponibilité de cet élément comme décrit précédemment pour d'autres souches favorables à la santé des plantes (Duijff et al., 1999; Höfte and Bakker, 2007; Matthijs et al., 2007). La plus faible activité antagoniste a été

observée pour une pvd de type c, produite par un *Pseudomonas* isolé du pois S. En revanche la pvd de la souche modèle *P. fluorescens* C7R12, également affiliée au type c, a présenté la plus forte activité antagoniste. Les solutions des 2 pyoverdines purifiées peuvent différer de différentes façons. En particulier elles pourraient se différencier par le type de sidérophore secondaire présent ou par sa quantité dans l'extrait purifié. Bien que minoritaires dans les extraits de pvd, les sidérophores secondaires sont néanmoins présents et seule une purification par HPLC permet de les éliminer des extraits de pvd. Néanmoins, il a été montré pour plusieurs pvd que les deux types d'extraction permettent d'obtenir des résultats comparables (Hartney et al., 2013). L'observation de la différence d'activité de 2 pvd de même type (c) montre les limites de l'utilisation des types IEF pour décrire certaines pvd. Des analyses complémentaires en spectrométrie de masse devraient permettre d'améliorer l'identification de ces molécules.

La forte variabilité des résultats obtenus dans les essais de protection des pois contre la pourriture racinaire par inoculation des souches de *Pseudomonas* en a limité l'exploitation. Un nombre de plantes par traitement plus important ou un autre type de bio-essai devront être utilisés à l'avenir. Néanmoins deux résultats intéressants peuvent être soulignés. Pour le pois S, la mortalité des plantes du traitement témoin est quasi-totale alors qu'un taux de mortalité moins important a été observé pour le pois T. Cette observation pourrait être l'indicateur d'une sensibilité à la maladie plus élevée pour le cultivar S. Des études complémentaires comprenant des essais au champ pourraient permettre d'apprécier l'intérêt de l'utilisation de résultats du pathotest développé dans cette étude (amélioré par l'augmentation du nombre de plantes par traitement) comme 'proxy' dans l'évaluation de la sensibilité de cultivars de pois à la pourriture racinaire. D'autre part, on peut remarquer que la souche modèle *P. fluorescens* C7R12, dont la pvd montre la plus forte activité antagoniste, est aussi celle protégeant le moins contre la maladie, des taux de mortalité identiques à ceux du témoin infesté ayant été observés après 21 jours. En revanche certains isolats du pois, différents selon le cultivar, ont réduit la mortalité des plantes. Ces expériences devront être répétées pour savoir si ces pourcentages de mortalité des plantes après 21 jours sont représentatifs d'une capacité de protection contre la maladie. Néanmoins, on peut déjà remarquer que cette protection potentielle n'est pas corrélée à l'antagonisme de la pvd via la compétition pour le fer. L'induction systémique de résistance (ISR) ou la production de molécules ayant une activité antibiotique sont d'autres mécanismes, déjà décrits pour des souches de *Pseudomonas*, qui pourraient être impliqués dans la protection de la plante (Carruthers et al., 1994; Haas and Défago, 2005).

5. Conclusions

En conclusion, les séquences partielles de *gacA* et *pvdQ* ciblées dans cette étude ont permis de déterminer l'appartenance de souches de référence à différents groupes taxonomiques du genre *Pseudomonas* préalablement définis sur la base de la concaténation de différents gènes de ménage (Gomila et al., 2015; Garrido-Sanz et al., 2016). Ils apparaissent donc comme des marqueurs taxonomiques intéressants et pratiques permettant d'identifier rapidement des souches et utilisables dans des études globales de communautés sans isolements préalables. Contrairement à *pvdQ*, *gacA* permet de décrire la diversité des *Pseudomonas* en incluant les espèces non fluorescentes. Les séquences partielles des 2 gènes permettent également de déterminer le type de pyoverdine produit par une souche inconnue en révélant son appartenance à certains groupes taxonomiques particuliers ou lorsqu'elle présente une forte identité avec des références dont la pvd est connue. La description d'une diversité fonctionnelle est donc limitée par la disponibilité de références. Néanmoins les séquences étudiées, et plus particulièrement celle de *pvdQ* qui présente le polymorphisme le plus important, peuvent être utilisées pour définir des amorces spécifiques de groupes fonctionnels particuliers à étudier. L'analyse des pyoverdines produites par les souches des différents groupes taxonomiques du complexe *P. fluorescens* a mis en évidence l'existence d'un type ou d'un ensemble de types de pvd partagés par les souches appartenant à un même groupe. La répartition de différents types de pvd au sein d'un même groupe taxonomique montre des incongruences avec la phylogénie du groupe et suggère l'existence de transferts horizontaux. Certains types de pvd semblent même pouvoir être retrouvés dans plusieurs groupes taxonomiques mais ces observations demandent à être confirmées par une analyse des pvd plus précise que celle des profils IEF.

Le travail réalisé sur les souches de références a permis de comparer la diversité taxonomique et fonctionnelle (pvd) de *Pseudomonas* isolés de 2 cultivars de pois présentant une tolérance différente à la chlorose ferrique. Aucune différence importante n'a été mise en évidence entre les 2 ensembles d'isolats sur la base des groupes taxonomiques. En revanche une différence intéressante a été observée au niveau fonctionnel. Le type de pvd le plus produit par les isolats des 2 pois était différent : t, pour le pois tolérant à la chlorose ferrique et d, pour le pois sensible. Cette observation illustre l'importance des études ciblant des caractères fonctionnels pour progresser dans la connaissance des interactions spécifiques entre la plante et son microbiote (Lemanceau et al., 2017b).

6. Références

- Baldani, J. I., Rouws, L., Cruz, L. M., Olivares, F. L., Schmid, M., and Hartmann, A. (2014). "The Family Oxalobacteraceae," in *The Prokaryotes*, eds. E. Rosenberg, E. F. DeLong, S. Lory, E. Stackebrandt, and F. Thompson (Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg), 919–974. doi:10.1007/978-3-642-30197-1_291.
- Balk, J., and Schaedler, T. A. (2014). Iron cofactor assembly in plants. *Annu Rev Plant Biol* 65, 125–153. doi:10.1146/annurev-arplant-050213-035759.
- Bansal, K., Midha, S., Kumar, S., Kaur, A., Sonti, R. V., and Patil, P. B. (2019). Ecological and evolutionary insights into pathogenic and non-pathogenic rice associated *Xanthomonas*. *bioRxiv*, 453373. doi:10.1101/453373.
- Berendsen, R. L., van Verk, M. C., Stringlis, I. A., Zamioudis, C., Tommassen, J., Pieterse, C. M. J., et al. (2015). Unearthing the genomes of plant-beneficial *Pseudomonas* model strains WCS358, WCS374 and WCS417. *BMC Genomics* 16. doi:10.1186/s12864-015-1632-z.
- Brear, E. M., Day, D. A., and Smith, P. M. C. (2013). Iron: an essential micronutrient for the legume-rhizobium symbiosis. *Front. Plant Sci.* 4, 359. doi:10.3389/fpls.2013.00359.
- Briat, J.-F., Dubos, C., and Gaymard, F. (2015). Iron nutrition, biomass production, and plant product quality. *Trends Plant Sci.* 20, 33–40. doi:10.1016/j.tplants.2014.07.005.
- Budzikiewicz, H. (2004). Siderophores of the Pseudomonadaceae sensu stricto (fluorescent and non-fluorescent *Pseudomonas* spp.). *Fortschr Chem Org Naturst* 87, 81–237. doi:doi.org/10.1007/978-3-7091-0581-8_2.
- Budzikiewicz, H., Kilz, S., Taraz, K., and Meyer, J.-M. (1997). Identical pyoverdines from *Pseudomonas fluorescens* 9AW and from *Pseudomonas putida* 9BW. *Zeitschrift für Naturforschung C* 52, 721–728. doi:10.1515/znc-1997-11-1202.
- Bulgarelli, D., Schlaeppi, K., Spaepen, S., van Themaat, E. V. L., and Schulze-Lefert, P. (2013). Structure and functions of the bacterial microbiota of plants. *Annu Rev Plant Biol* 64, 807–838. doi:10.1146/annurev-arplant-050312-120106.
- Bultreys, A., Gheysen, I., Wathélet, B., Maraite, H., and de Hoffmann, E. (2003). High-performance liquid chromatography analyses of pyoverdin siderophores differentiate among phytopathogenic fluorescent *Pseudomonas* species. *Appl. Environ. Microbiol.* 69, 1143–1153. doi:10.1128/AEM.69.2.1143-1153.2003.
- Caporaso, J. G., Kuczynski, J., Stombaugh, J., Bittinger, K., Bushman, F. D., Costello, E. K., et al. (2010). QIIME allows analysis of high-throughput community sequencing data. *Nat Methods* 7, 335–336. doi:10.1038/nmeth.f.303.
- Carruthers, F. L., Conner, A. J., and Mahanty, H. K. (1994). Identification of a genetic locus in *Pseudomonas aureofaciens* involved in fungal inhibition. *Appl. Environ. Microbiol.* 60, 71–77.
- Chandrangsu, P., Rensing, C., and Helmann, J. D. (2017). Metal homeostasis and resistance in bacteria. *Nat Rev Microbiol* 15, 338–350. doi:10.1038/nrmicro.2017.15.
- Clevenger, K. D., Mascarenhas, R., Catlin, D., Wu, R., Kelleher, N. L., Drake, E. J., et al. (2017). Substrate trapping in the siderophore tailoring enzyme PvdQ. *ACS Chem. Biol.* 12, 643–647. doi:10.1021/acscchembio.7b00031.
- Compant, S., Samad, A., Faist, H., and Sessitsch, A. (2019). A review on the plant microbiome: ecology, functions, and emerging trends in microbial application. *J. Adv. Res* 19, 29–37. doi:10.1016/j.jare.2019.03.004.

- Cornelis, P. (2010). Iron uptake and metabolism in pseudomonads. *Applied Microbiology and Biotechnology* 86, 1637–1645. doi:10.1007/s00253-010-2550-2.
- Costa, R., Gomes, N. C. M., Krögerrecklenfort, E., Opelt, K., Berg, G., and Smalla, K. (2007). *Pseudomonas* community structure and antagonistic potential in the rhizosphere: insights gained by combining phylogenetic and functional gene-based analyses. *Environ. Microbiol.* 9, 2260–2273. doi:10.1111/j.1462-2920.2007.01340.x.
- Costa, R., Salles, J. F., Berg, G., and Smalla, K. (2006). Cultivation-independent analysis of *Pseudomonas* species in soil and in the rhizosphere of field-grown *Verticillium dahliae* host plants. *Environ. Microbiol.* 8, 2136–2149. doi:10.1111/j.1462-2920.2006.01096.x.
- Curie, C., and Briat, J.-F. (2003). Iron transport and signaling in plants. *Annu Rev Plant Biol* 54, 183–206. doi:10.1146/annurev.arplant.54.031902.135018.
- Curie, C., and Mari, S. (2017). New routes for plant iron mining. *New Phytol* 214, 521–525. doi:10.1111/nph.14364.
- De Souza, J. T., Mazzola, M., and Raaijmakers, J. M. (2003). Conservation of the response regulator gene *gacA* in *Pseudomonas* species: conservation of *gacA* in *Pseudomonas*. *Environ Microbiol* 5, 1328–1340. doi:10.1111/j.1462-2920.2003.00438.x.
- Delorme, S., Corberand, T., Meyer, J.-M., Gardan, L., Lemanceau, P., and Christen, R. (2002). *Pseudomonas lini* sp. nov., a novel species from bulk and rhizospheric soils. *Int J Syst Evol Microbiol* 52, 513–523. doi:10.1099/00207713-52-2-513.
- Duijff, B. J., Recorbet, G., Bakker, P. A. H. M., Loper, J. E., and Lemanceau, P. (1999). Microbial antagonism at the root level is involved in the suppression of fusarium wilt by the combination of non pathogenic *Fusarium oxysporum* Fo47 and *Pseudomonas putida* WCS358. *Phytopathology* 89, 1073–1079. doi:10.1094/PHYTO.1999.89.11.1073.
- Edgar, R. C. (2010). Search and clustering orders of magnitude faster than BLAST. *Bioinformatics* 26, 2460–2461. doi:10.1093/bioinformatics/btq461.
- Fourcroy, P., Sisó-Terraza, P., Sudre, D., Savirón, M., Rey, G., Gaymard, F., et al. (2014). Involvement of the ABCG37 transporter in secretion of scopoletin and derivatives by *Arabidopsis* roots in response to iron deficiency. *New Phytol* 201, 155–167. doi:10.1111/nph.12471.
- Frey, P., Frey-Klett, P., Garbaye, J., Berge, O., and Heulin, T. (1997). Metabolic and genotypic fingerprinting of fluorescent *Pseudomonas* associated with the Douglas Fir-Laccaria bicolor mycorrhizosphere. *Appl. Environ. Microbiol.* 63, 1852–1860.
- Fromin, N., Achouak, W., Thiéry, J. M., and Heulin, T. (2001). The genotypic diversity of *Pseudomonas brassicacearum* populations isolated from roots of *Arabidopsis thaliana*: influence of plant genotype. *FEMS Microbiol Ecol* 37, 21–29. doi:10.1111/j.1574-6941.2001.tb00849.x.
- Fuchs, R., Schafer, M., Geoffroy, V., and Meyer, J.-M. (2001). Siderotyping a powerful tool for the characterization of pyoverdines. *Curr Top Med Chem* 1, 31–57. doi:10.2174/1568026013395542.
- Garrido-Sanz, D., Meier-Kolthoff, J. P., Göker, M., Martín, M., Rivilla, R., and Redondo-Nieto, M. (2016). Genomic and genetic diversity within the *Pseudomonas fluorescens* complex. *PLoS ONE* 11, e0150183. doi:10.1371/journal.pone.0150183.
- Ge, L., and Seah, S. Y. K. (2006). Heterologous expression, purification, and characterization of an l-ornithine N5-hydroxylase involved in pyoverdine siderophore biosynthesis in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol* 188, 7205–7210. doi:10.1128/JB.00949-06.

- Geels, F. P., and Schippers, B. (1983). Selection of antagonistic fluorescent *Pseudomonas* spp. and their root colonization and persistence following treatment of seed potatoes. *J Phytopathol* 108, 193–206. doi:10.1111/j.1439-0434.1983.tb00579.x.
- Ghirardi, S., Dessaint, F., Mazurier, S., Corberand, T., Raaijmakers, J. M., Meyer, J.-M., et al. (2012). Identification of traits shared by rhizosphere-competent strains of fluorescent pseudomonads. *Microbial Ecology* 64, 725–737. doi:10.1007/s00248-012-0065-3.
- Gildersleeve, R. R., and Ocumpaugh, W. R. (1989). Greenhouse evaluation of subterranean clover species for susceptibility to iron-deficiency chlorosis. *Crop science* 29, 949–951.
- Gomila, M., Pena, A., Mulet, M., Lalucat, J., and Garci-a-Valdés, E. (2015). Phylogenomics and systematics in *Pseudomonas*. *Front. Microbiol.* 6, 214. doi:10.3389/fmicb.2015.00214.
- Haas, D., and Défago, G. (2005). Biological control of soil-borne pathogens by fluorescent pseudomonads. *Nat Rev Microbiol* 3, 307–319. doi:10.1038/nrmicro1129.
- Hartney, S. L., Mazurier, S., Girard, M. K., Mehnaz, S., Davis, E. W., Gross, H., et al. (2013). Ferric-pyoverdine recognition by Fpv outer membrane proteins of *Pseudomonas protegens* Pf-5. *J. Bacteriol.* 195, 765–776. doi:10.1128/JB.01639-12.
- Helms, T. C., Scott, R. A., Schapaugh, W. T., Goos, R. J., Franzen, D. W., and Schlegel, A. J. (2010). Soybean iron-deficiency chlorosis tolerance and yield decrease on calcareous soils. *Agron J.* 102, 492. doi:10.2134/agronj2009.0317.
- Höfte, M., and Bakker, P. A. H. M. (2007). “Competition for iron and induced systemic resistance by siderophores of plant growth promoting rhizobacteria,” in *Microbial Siderophores Soil Biology.*, eds. A. Varma and S. B. Chincholkar (Berlin, Heidelberg: Springer), 121–133. doi:10.1007/978-3-540-71160-5_6.
- Jin, C. W., Li, G. X., Yu, X. H., and Zheng, S. J. (2010). Plant Fe status affects the composition of siderophore-secreting microbes in the rhizosphere. *Ann Bot* 105, 835–841. doi:10.1093/aob/mcq071.
- Jones, P., Garcia, B. J., Furches, A., Tuskan, G. A., and Jacobson, D. (2019). Plant host-associated mechanisms for microbial selection. *Front. Plant Sci.* 10, 862. doi:10.3389/fpls.2019.00862.
- Jülich, M., Taraz, K., Budzikiewicz, H., Geoffroy, V., Meyer, J.-M., and Gardan, L. (2001). The structure of the pyoverdine isolated from various *Pseudomonas syringae* pathovars. *Zeitschrift für Naturforschung C* 56, 687–694. doi:10.1515/znc-2001-9-1003.
- Kerstens, K., Ludwig, W., Vancanneyt, M., De Vos, P., Gillis, M., and Schleifer, K.-H. (1996). Recent changes in the classification of the pseudomonads. *Systematic and Applied Microbiology* 19, 465–477. doi:10.1016/S0723-2020(96)80020-8.
- Kimura, M. (1980). A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *J Mol Evol* 16, 111–120. doi:10.1007/BF01731581.
- Kloepper, J. W., Leong, J., Teintze, M., and Schroth, M. N. (1980). *Pseudomonas* siderophores: A mechanism explaining disease-suppressive soils. *Curr. Microbiol.* 4, 317–320. doi:10.1007/BF02602840.
- Kluyver, T., Benjamin, R.-K., Fernando, P., Brian, G., Matthias, B., Jonathan, F., et al. (2016). Jupyter Notebooks: a publishing format for reproducible computational workflows. *Stand Alone*, 87–90. doi:10.3233/978-1-61499-649-1-87.
- Kobayashi, T., and Nishizawa, N. K. (2012). Iron uptake, translocation, and regulation in higher plants. *Annual Review of Plant Biology* 63, 131–152. doi:10.1146/annurev-arplant-042811-105522.

- Koedam, N., Wittouck, E., Gaballa, A., Gillis, A., Höfte, M., and Cornelis, P. (1994). Detection and differentiation of microbial siderophores by isoelectric focusing and chrome azurol S overlay. *Biometals* 7, 287-291. doi:10.1007/BF00144123.
- Landa, B. B., Mavrodi, O. V., Raaijmakers, J. M., McSpadden Gardener, B. B., Thomashow, L. S., and Weller, D. M. (2002). Differential ability of genotypes of 2,4-diacetylphloroglucinol-producing *Pseudomonas fluorescens* strains to colonize the roots of pea plants. *Appl. Environ. Microbiol.* 68, 3226–3237. doi:10.1128/AEM.68.7.3226-3237.2002.
- Lemanceau, P., Barret, M., Mazurier, S., Mondy, S., Pivato, B., Fort, T., et al. (2017a). “Plant communication with associated microbiota in the spermosphere, rhizosphere and phyllosphere,” in *Advances in Botanical Research* (Elsevier), 101–133. doi:10.1016/bs.abr.2016.10.007.
- Lemanceau, P., Blouin, M., Muller, D., and Moëgne-Loccoz, Y. (2017b). Let the core microbiota be functional. *Trends Plant Sci.* 22, 583–595. doi:10.1016/j.tplants.2017.04.008.
- Lemanceau, P., Corberand, T., Gardan, L., Latour, X., Laguerre, G., Boeufgras, J., et al. (1995). Effect of two plant species, flax (*Linum usitatissimum* L.) and Tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.), on the diversity of soilborne populations of fluorescent pseudomonads. *Appl. Environ. Microbiol.* 61, 1004–1012.
- Longnecker, N., and Welch, R. M. (1990). Accumulation of apoplastic iron in plant roots: A factor in the resistance of soybeans to iron-deficiency induced chlorosis? *Plant Physiol.* 92, 17–22. doi:10.1104/pp.92.1.17.
- Mahmoudi, H., Koyro, H.-W., Debez, A., and Abdelly, C. (2009). Comparison of two chickpea varieties regarding their responses to direct and induced Fe deficiency. *Environ. Exp. Bot.* 66, 349–356. doi:10.1016/j.envexpbot.2009.03.013.
- Matthijs, S., Brandt, N., Ongena, M., Achouak, W., Meyer, J.-M., and Budzikiewicz, H. (2016). Pyoverdine and histocorrugatin-mediated iron acquisition in *Pseudomonas thivervalensis*. *Biometals* 29, 467–485. doi:10.1007/s10534-016-9929-1.
- Matthijs, S., Tehrani, K. A., Laus, G., Jackson, R. W., Cooper, R. M., and Cornelis, P. (2007). Thioquinolobactin, a *Pseudomonas* siderophore with antifungal and anti-*Pythium* activity. *Environ. Microbiol.* 9, 425–434. doi:10.1111/j.1462-2920.2006.01154.x.
- Mazurier, S., Corberand, T., Lemanceau, P., and Raaijmakers, J. M. (2009). Phenazine antibiotics produced by fluorescent pseudomonads contribute to natural soil suppressiveness to *Fusarium* wilt. *Int. Soc. Microbial Ecol. J* 3, 977–991. doi:10.1038/ismej.2009.33.
- Mazurier, S., Merieau, A., Bergeau, D., Decoin, V., Sperandio, D., Crépin, A., et al. (2015). Type III secretion system and virulence markers highlight similarities and differences between Human- and plant-associated pseudomonads related to *Pseudomonas fluorescens* and *P. putida*. *Appl. Environ. Microbiol.* 81, 2579–2590. doi:10.1128/AEM.04160-14.
- McDonald, D., Price, M. N., Goodrich, J., Nawrocki, E. P., DeSantis, T. Z., Probst, A., et al. (2012). An improved Greengenes taxonomy with explicit ranks for ecological and evolutionary analyses of bacteria and archaea. *Int. Soc. Microbial Ecol. J* 6, 610–618. doi:10.1038/ismej.2011.139.
- Meyer, J. M., and Abdallah, M. A. (1978). The fluorescent pigment of *Pseudomonas fluorescens*: biosynthesis, purification and physicochemical properties. *Microbiology* 107, 319–328. doi:doi.org/10.1099/00221287-107-2-319.
- Meyer, J.-M., Geoffroy, V. A., Baida, N., Gardan, L., Izard, D., Lemanceau, P., et al. (2002). Siderophore typing, a powerful tool for the identification of fluorescent and nonfluorescent pseudomonads. *Appl. Environ. Microbiol.* 68, 2745–2753. doi:10.1128/AEM.68.6.2745-2753.2002.

- Meyer, J.-M., Gruffaz, C., Tulkki, T., and Izard, D. (2007). Taxonomic heterogeneity, as shown by siderotyping, of strains primarily identified as *Pseudomonas putida*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 57, 2543–2556. doi:10.1099/ijs.0.65233-0.
- Meyer, J.-M., Stintzi, A., Coulanges, V., Shivaji, S., Voss, J. A., Taraz, K., et al. (1998). Siderotyping of fluorescent pseudomonads: characterization of pyoverdines of *Pseudomonas fluorescens* and *Pseudomonas putida* strains from Antarctica. *Microbiology* 144, 3119–3126.
- Meyer, J.-M., Stintzi, A., De Vos, D., Cornelis, P., Tappe, R., Taraz, K., et al. (1997). Use of siderophores to type pseudomonads: the three *Pseudomonas aeruginosa* pyoverdine systems. *Microbiology* 143, 35–43. doi:10.1099/00221287-143-1-35.
- Mulet, M., Lalucat, J., and García-Valdés, E. (2010). DNA sequence-based analysis of the *Pseudomonas* species. *Environ. Microbiol.* doi:10.1111/j.1462-2920.2010.02181.x.
- Neilands, J. B. (2014). *Microbial Iron Metabolism: A Comprehensive Treatise*. Academic Press.
- Petric, I., Philippot, L., Abbate, C., Bispo, A., Chesnot, T., Hallin, S., et al. (2011). Inter-laboratory evaluation of the ISO standard 11063 “Soil quality — Method to directly extract DNA from soil samples.” *J Microbiol Methods* 84, 454–460. doi:10.1016/j.mimet.2011.01.016.
- Picard, C., and Bosco, M. (2005). Maize heterosis affects the structure and dynamics of indigenous rhizospheric auxins-producing *Pseudomonas* populations. *FEMS Microbiol Ecol* 53, 349–357. doi:10.1016/j.femsec.2005.01.007.
- Plassart, P., Terrat, S., Thomson, B., Griffiths, R., Dequiedt, S., Lelievre, M., et al. (2012). Evaluation of the ISO standard 11063 DNA extraction procedure for assessing soil microbial abundance and community structure. *PLOS ONE* 7, e44279. doi:10.1371/journal.pone.0044279.
- Ponraj, P., Shankar, M., Ilakkiam, D., and Gunasekaran, P. (2012). Influence of siderophore pyoverdine synthesis and iron-uptake on abiotic and biotic surface colonization of *Pseudomonas putida* S11. *Biometals: An International Journal on the Role of Metal Ions in Biology, Biochemistry, and Medicine* 25, 1113–1128. doi:10.1007/s10534-012-9574-2.
- Putignani, L., Ambrosi, C., Ascenzi, P., and Visca, P. (2004). Expression of l-ornithine N δ -oxygenase (PvdA) in fluorescent *Pseudomonas* species: an immunochemical and in silico study. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 313, 245–257. doi:10.1016/j.bbrc.2003.11.116.
- Raaijmakers, J. M., Weller, D. M., and Thomashow, L. S. (1997). Frequency of antibiotic-producing *Pseudomonas* spp. in natural environments. *Appl. Environ. Microbiol.* 63, 881–887.
- Rezzonico, F., Défago, G., and Moënne-Loccoz, Y. (2004). Comparison of ATPase-encoding type III secretion system hrcN genes in biocontrol fluorescent *Pseudomonas* and in phytopathogenic proteobacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* 70, 5119–5131. doi:10.1128/AEM.70.9.5119-5131.2004.
- Ringel, M. T., and Brüser, T. (2018). The biosynthesis of pyoverdines. *Microbial Cell* 5, 424–437. doi:10.15698/mic2018.10.649.
- Ringel, M. T., Dräger, G., and Brüser, T. (2017). The periplasmic transaminase PtaA of *Pseudomonas fluorescens* converts the glutamic acid residue at the pyoverdine fluorophore to α -ketoglutaric acid. *J. Biol. Chem.* 292, 18660–18671. doi:10.1074/jbc.M117.812545.
- Robin, A., Mazurier, S., Mougél, C., Vansuyt, G., Corberand, T., Meyer, J.-M., et al. (2007). Diversity of root-associated fluorescent pseudomonads as affected by ferritin overexpression in tobacco: diversity of fluorescent pseudomonads in rhizosphere. *Environ. Microbiol.* 9, 1724–1737. doi:10.1111/j.1462-2920.2007.01290.x.

- Robin, A., Mougel, C., Siblot, S., Vansuyt, G., Mazurier, S., and Lemanceau, P. (2006). Effect of ferritin overexpression in tobacco on the structure of bacterial and pseudomonad communities associated with the roots: structure of rhizosphere bacterial and pseudomonad communities. *FEMS Microbiol Ecol* 58, 492–502. doi:10.1111/j.1574-6941.2006.00174.x.
- Robin, A., Vansuyt, G., Hinsinger, P., Meyer, J. M., Briat, J. F., and Lemanceau, P. (2008). “Chapter 4 Iron dynamics in the rhizosphere,” in *Advances in Agronomy* (Elsevier), 183–225. Available at: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0065211308004045>.
- Rognes, T., Flouri, T., Nichols, B., Quince, C., and Mahé, F. (2016). VSEARCH: a versatile open source tool for metagenomics. *PeerJ* 4, e2584. doi:10.7717/peerj.2584.
- Saitou, N., and Nei, M. (1987). The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol Biol Evol* 4, 406–425. doi:10.1093/oxfordjournals.molbev.a040454.
- Saleem, M., Hu, J., and Jousset, A. (2019). More than the sum of its parts: microbiome biodiversity as a driver of plant growth and soil health. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics* 50, 145–168. doi:10.1146/annurev-ecolsys-110617-062605.
- Schmid, N. B., Giehl, R. F. H., Döll, S., Mock, H.-P., Strehmel, N., Scheel, D., et al. (2014). Feruloyl-CoA 6'-Hydroxylase1-dependent coumarins mediate iron acquisition from alkaline substrates in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* 164, 160–172. doi:10.1104/pp.113.228544.
- Schmidt, H., Günther, C., Weber, M., Spörlein, C., Loscher, S., Böttcher, C., et al. (2014). Metabolome analysis of *Arabidopsis thaliana* roots identifies a key ketabolic pathway for iron acquisition. *PLoS ONE* 9, e102444. doi:10.1371/journal.pone.0102444.
- Shanahan, P., O'sullivan, D. J., Simpson, P., Glennon, J. D., and O'gara, F. (1992). Isolation of 2,4-diacetylphloroglucinol from a fluorescent pseudomonad and investigation of physiological parameters influencing its production. *Appl. Environ. Microbiol.* 58, 353–358.
- Shi, R., Melzer, M., Zheng, S., Benke, A., Stich, B., and von Wirén, N. (2018). Iron retention in root hemicelluloses causes genotypic variability in the tolerance to iron deficiency-induced chlorosis in maize. *Front. Plant Sci.* 9, 557. doi:10.3389/fpls.2018.00557.
- Shirley, M., Avoscan, L., Bernaud, E., Vansuyt, G., and Lemanceau, P. (2011). Comparison of iron acquisition from Fe-pyoverdine by strategy I and strategy II plants. *Botany* 89, 731–735. doi:10.1139/b11-054.
- Sievers, F., Wilm, A., Dineen, D., Gibson, T. J., Karplus, K., Li, W., et al. (2011). Fast, scalable generation of high-quality protein multiple sequence alignments using Clustal Omega. *Mol Syst Biol* 7, 539. doi:10.1038/msb.2011.75.
- Smith, E. E., Sims, E. H., Spencer, D. H., Kaul, R., and Olson, M. V. (2005). Evidence for diversifying selection at the pyoverdine locus of *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Bacteriol.* 187, 2138–2147. doi:10.1128/JB.187.6.2138-2147.2005.
- Stringlis, I. A., Yu, K., Feussner, K., de Jonge, R., Van Bentum, S., Van Verk, M. C., et al. (2018). MYB72-dependent coumarin exudation shapes root microbiome assembly to promote plant health. *Proc Natl Acad. Sci* 115, E5213–E5222. doi:10.1073/pnas.1722335115.
- Trapet, P., Avoscan, L., Klinguer, A., Pateyron, S., Citerne, S., Chervin, C., et al. (2016). The *Pseudomonas fluorescens* siderophore pyoverdine weakens *Arabidopsis thaliana* defense in favor of growth in iron-deficient conditions. *Plant Physiol.* 171, 675–693. doi:10.1104/pp.15.01537.
- Vansuyt, G., Robin, A., Briat, J.-F., Curie, C., and Lemanceau, P. (2007). Iron acquisition from Fe-pyoverdine by *Arabidopsis thaliana*. *MPMI* 20, 441–447. doi:doi.org/10.1094/MPMI-20-4-0441.

- Viollet, A., Corberand, T., Mougel, C., Robin, A., Lemanceau, P., and Mazurier, S. (2011). Fluorescent pseudomonads harboring type III secretion genes are enriched in the mycorrhizosphere of *Medicago truncatula*: Pseudomonads harboring T3SS are enriched in mycorrhizosphere. *FEMS Microbiol Ecol* 75, 457–467. doi:10.1111/j.1574-6941.2010.01021.x.
- Visca, P., Ciervo, A., and Orsi, N. (1994). Cloning and nucleotide sequence of the *pvdA* gene encoding the pyoverdin biosynthetic enzyme L-ornithine N5-oxygenase in *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Bacteriol.* 176, 1128–1140. doi:10.1128/jb.176.4.1128-1140.1994.
- Waters, B. M., Amundsen, K., and Graef, G. (2018). Gene expression profiling of iron deficiency chlorosis sensitive and tolerant soybean indicates key roles for phenylpropanoids under alkalinity stress. *Front. Plant Sci.* 9, 10. doi:10.3389/fpls.2018.00010.
- Wicker, E., Hulle, M., and Rouxel, F. (2001). Pathogenic characteristics of isolates of *Aphanomyces euteiches* from pea in France. *Plant Physiol.* 50, 433–442. doi:10.1046/j.1365-3059.2001.00590.x.
- World Health Organization (2019). WHO. *Anémie ferriprive*. Available at: <https://www.who.int/nutrition/topics/ida/fr/>.
- Wright, W. H. (1925). The nodule bacteria of soybeans: I. Bacteriology of strains. *Soil Science* 20, 95.
- Zhang, J., Kobert, K., Flouri, T., and Stamatakis, A. (2014). PEAR: a fast and accurate Illumina Paired-End reAd mergeR. *Bioinformatics* 30, 614–620. doi:10.1093/bioinformatics/btt593.
- Zou, C.-S., Mo, M.-H., Gu, Y.-Q., Zhou, J.-P., and Zhang, K.-Q. (2007). Possible contributions of volatile-producing bacteria to soil fungistasis. *Soil Biol. Biochem.* 39, 2371–2379. doi:10.1016/j.soilbio.2007.04.009.
- Zribi, K., and Gharsalli, M. (2002). Effect of bicarbonate on growth and iron nutrition of pea. *J. Plant Nutr.* 25, 2143–2149. doi:10.1081/PLN-120014066.

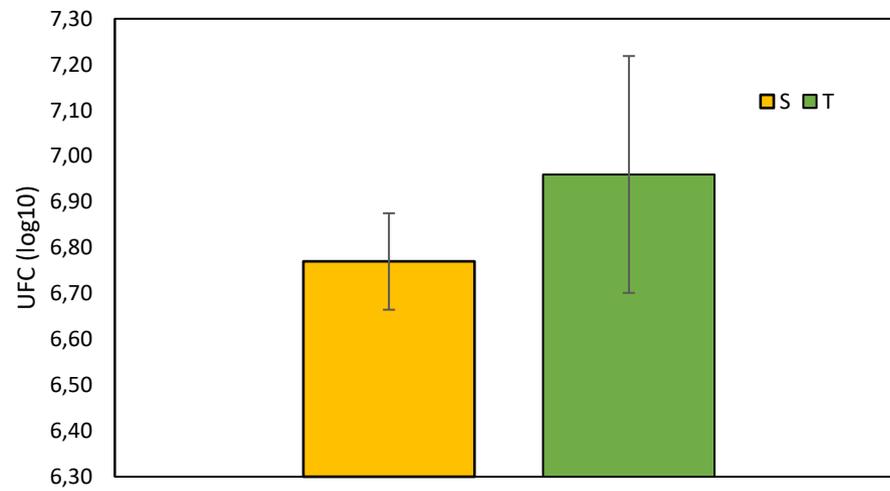


Figure 2. Résultats des dénombrements sur milieu King B de bactéries fluorescentes associées aux racines des pois S et T cultivés au champ.

Résultats complémentaires

Des dénombrements sur milieu King B (King et al., 1954) ont été effectués au cours des isollements bactériens réalisés à partir des pois S et T cultivés au champ. Le nombre de bactéries cultivables présenté est la moyenne des résultats des dénombrements réalisés sur 4 échantillons composites constitués chacun de plantes cultivées dans une parcelle différente (**Figure 2**). Aucune différence significative n'a été observée entre les 2 cultivars. Des résultats similaires ont été obtenus par Robin *et al.* (2007) pour les *Pseudomonas* spp. fluorescents associés à un tabac transgénique surexpresser de ferritine et au tabac sauvage.

Bilan

La séquence partielle de *gacA* étudiée s'est révélée être un bon marqueur pour décrire la diversité taxonomique des *Pseudomonas*. En effet, les regroupements de souches de référence observés sur la base de l'analyse de cette séquence correspondaient aux groupes taxonomiques décrits chez les *Pseudomonas* par l'analyse d'un ensemble de gènes de ménage (Gomila et al., 2015; Garrido-Sanz et al., 2016). Concernant la diversité des pyoverdines, les deux gènes *gacA* et *pvdQ* peuvent fournir les mêmes informations. Lorsque des souches sont regroupées sur la base d'une identité, ou d'une très forte homologie supportée par une forte valeur de bootstrap pour l'une de ces séquences, on peut en déduire qu'elles produisent la même pyoverdine. Toutefois, l'identification du type de pyoverdine correspondant dépend de la présence d'une souche de référence de pyoverdine connue dans le même groupe.

La comparaison des bactéries associées aux deux cultivars de pois étudiés a mis en évidence des différences dans la structure des communautés totales. Pour les *Pseudomonas*, aucune différence n'a été mise en évidence sur la base de leur appartenance à un groupe taxonomique. Les isolats appartenaient majoritairement aux groupes *P. koreensis* et *P. fluorescens* sans différence significative de représentation pour les deux pois. En revanche, des différences ont été mises en évidence par l'analyse de caractéristiques fonctionnelles liées au fer des souches. Les souches associées au pois T, tolérant à la chlorose, étaient globalement plus aptes à résister à une carence en fer que celles isolées du pois S, sensible à la chlorose. Là encore, les résultats étaient comparables à ceux obtenus par Robin *et al.* (2007) avec un tabac transgénique suraccumulant le fer et un tabac sauvage. Par ailleurs si les deux pois ont

recruté des *Pseudomonas* synthétisant globalement les mêmes types de pyoverdines, la pyoverdine produite majoritairement était différente selon le cultivar. Les résultats obtenus ont donc montré que des géotypes de pois différant dans leur capacité à gérer un manque de fer recrutent des microbiotes rhizosphériques qui diffèrent. Ces différences concernent notamment les propriétés fonctionnelles liées au fer des *Pseudomonas* spp. fluorescents. Il est maintenant intéressant de déterminer (i) si lorsqu'ils sont cultivés dans des sols différents, ces pois recrutent des bactéries possédant les mêmes caractéristiques fonctionnelles et (ii) si les pyoverdines majoritairement produites par les bactéries associées à chacun des pois (pvd1T, pour le pois T et pvd2S, pour le pois S) ont des effets différents sur le statut en fer de ces deux plantes. Ce dernier point a fait l'objet de l'étude présentée dans le chapitre suivant. La question relative aux caractéristiques fonctionnelles des microbiotes recrutés dans des sols différents est en cours d'étude dans le cadre d'un projet en lien avec mon projet de thèse (POSiTiF, projet de l'institut Carnot Plant2Pro).

Chapitre III : Impact de sidérophores bactériens sur le statut en fer et le ionome du pois

Manuscrit accepté à "Frontiers in Plant Science"

doi: 10.3389/fpls.2020.00730

Avant-propos

Après avoir mis en évidence des différences dans le microbiote rhizosphérique recruté par les deux cultivars de pois étudiés, l'objectif principal de ce travail a été de déterminer si, en retour, ces différences pourraient impacter le statut en fer et le ionome des plantes.

Pour cela, l'effet d'apports de fer sous la forme de ferrisidérophores préparés avec les pyoverdines majoritairement produites par les *Pseudomonas* associés au pois T et au pois S, respectivement pvd1T et pvd2S, a été comparé pour les deux pois. Les apports en fer ont été réalisés en conditions contrôlées sur des plantules de pois cultivées *in vitro* en présence d'une petite quantité de fer résiduel. Un apport en fer a également été réalisé avec une pyoverdine modèle (pvdC7R12) déjà étudiée pour sa capacité à modifier la nutrition en fer de plantes comme *Arabidopsis* ou des graminées pérennes (Shirley *et al.*, 2011; Trapet *et al.*, 2016; Vansuyt *et al.*, 2007). Des plantes témoins de deux types ont été utilisées ; des plantes ne recevant aucun apport de fer et des plantes recevant un apport de fer sous forme d'un chélat chimique (Fe-EDTA). Le travail a été complété par l'étude de l'effet d'une inoculation de la souche produisant la pyoverdine modèle, *P. fluorescens* C7R12, et de son mutant ne produisant plus de pyoverdine (pvd-) PL1. Les biomasses et les concentrations en fer (Fe) et en 12 autres éléments (Na, K, Co, Mo, Zn, Cu, Mn, Ca, Mg, B, P et S) des plantes ayant subi les différents traitements ont été évaluées dans les racines et les parties aériennes et comparées.

Impact of bacterial siderophores on iron status and ionome in pea

Tristan Lurthy¹, Cécile Cantat¹, Christian Jeudy¹, Philippe Declerck², Karine Gallardo¹, Catherine Barraud¹, Fanny Leroy³, Alain Ourry⁴, Philippe Lemanceau¹, Christophe Salon¹, Sylvie Mazurier^{1*}

¹ Agroécologie, AgroSup Dijon, INRAE, Univ. Bourgogne, Univ. Bourgogne Franche-Comté, F-21000 Dijon, France

²RAGT 2n, Route d'Epincy. F-28150 Louville-La-Chenard, France

³ Normandie Université, UNICAEN, PLATIN', Esplanade de la Paix, CS14032, 14032 Caen Cedex 5, France

⁴ Normandie Université, UNICAEN, INRAE, UMR 950 Ecophysiologie Végétale, Agronomie et nutriments N, C, S, Esplanade de la Paix, CS14032, 14032 Caen Cedex 5, France

Running title: Pyoverdine and pea iron nutrition

E-mail adress : tristan.lurthy@inra.fr; cantatcecile@yahoo.fr; christian.jeudy.2@inra.fr; pdeclerck@ragt.fr; karine.gallardo-guerrero@inra.fr; catherine.barraud@inra.fr; fanny.leroy@unicaen.fr; alain.ourry@unicaen.fr ; philippe.lemanceau@inra.fr; christophe.salon@inra.fr; sylvie.mazurier@inra.fr

Key words: Pea, *Pseudomonas*, siderophore, plant iron nutrition, pyoverdine, iron deficiency, IDC.

Total number of tables: 1

Total number of figures: 4

Manuscript length: 5077 words

Correspondence: S. Mazurier, UMR 1347 Agroécologie, 17 rue Sully, BV 86510, F-21065 Dijon cedex, France

E-mail: sylvie.mazurier@inra.fr

Phone: +33 3 80 69 30 93

1. Abstract

Including more grain legumes in cropping systems is important for the development of agroecological practices and the diversification of protein sources for human and animal consumption. Grain legume yield and quality is impacted by abiotic stresses resulting from fluctuating availabilities in essential nutrients such as iron deficiency chlorosis (IDC). Promoting plant iron nutrition could mitigate IDC that currently impedes legume cultivation in calcareous soils and increase the iron content of legume seeds and its bioavailability. There is growing evidence that plant microbiota contribute to plant iron nutrition and might account for variations in the sensitivity of pea cultivars to iron deficiency and *in fine* to seed nutritional quality. Pyoverdine (pvd) siderophores synthesized by pseudomonads have been shown to promote iron nutrition in various plant species (*Arabidopsis*, clover and grasses). This study aimed to investigate the impact of three distinct ferripyoverdines (Fe-pvds) on iron status and the ionome of two pea cultivars (cv.) differing in their tolerance to IDC, (cv. S) being susceptible and (cv. T) tolerant. One pvd came from a pseudomonad strain isolated from the rhizosphere of cv. T (pvd1T), one from cv. S (pvd2S), and the third from a reference strain C7R12 (pvdC7R12). The results indicated that Fe-pvds differently impacted pea iron status and ionome, and that this impact varied both according to the pvd and the cultivar. Plant iron concentration was more increased by Fe-pvds in cv. T than in cv. S. Iron allocation within the plant was impacted by Fe-pvds in cv. T. Furthermore, Fe-pvds had the greatest favorable impact on iron nutrition in the cultivar from which the producing strain originated. This study evidences the impact of bacterial siderophores on pea iron status and pea ionome composition, and shows that this impact varies with the siderophore and host-plant cultivar, thereby emphasizing the specificity of these plant-microorganisms interactions. Our results support the possible contribution of pyoverdine-producing pseudomonads to differences in tolerance to IDC between pea cultivars. Indeed, the tolerant cv. T, as compared to the susceptible cv. S, benefited from bacterial siderophores for its iron nutrition to a greater extent.

2. Introduction

Iron (Fe) is a micronutrient essential for living organisms, microorganisms, plants and humans. It is indispensable to plant growth and crop iron content is a key determinant for human health (Briat *et al.*, 2015). In soils, the total Fe often exceeds plant requirements but its bioavailability, being largely dependent on pH and redox conditions, is low in the circumneutral environments in which many crop plants are grown (Lemanceau *et al.*, 2009). Iron bioavailability decreases sharply when pH increases with the result that iron is a limiting factor for plant growth in calcareous soils (i.e. as much as 30% of world soils) (Chen and Barak, 1982). Plants and microorganisms have therefore developed active strategies for iron uptake.

Microorganisms release siderophores that chelate iron and subsequently internalize the resulting complexes within their cytoplasm (Hider and Kong, 2010). Most research on iron nutrition in plants is focused on two active strategies: (i) strategy I found in non-graminaceous monocotyledons and dicotyledons and relying on rhizosphere acidification, reduction of Fe^{3+} , and Fe^{2+} incorporation into the root, and (ii) strategy II found in grasses and relying on the excretion of phytosiderophores which scavenge Fe^{3+} before being incorporated into the root (Kobayashi and Nishizawa, 2012). However, this differentiation of plant species according to their iron uptake strategy is now known to be an oversimplification as both strategies contribute to iron nutrition in rice and peanut (Ishimaru *et al.*, 2006; Xiong *et al.*, 2013). In addition, fluorescent phenolic compounds produced by different plant species exert siderophore activity and represent a possible additional active strategy for both types of plant species especially in alkaline environments (Fourcroy *et al.*, 2014; Schmidt *et al.*, 2014).

Efficiency of plant iron nutrition varies considerably according to the plant crop (Hansen *et al.*, 2006). For example, legumes (clover, soybean, chickpea, pea...) are known to differ greatly in their susceptibility to iron deficiency chlorosis (IDC) between species and between cultivars within a given species (Gildersleeve and Ocumpaugh, 1989; Zribi and Gharsalli, 2002; Mahmoudi *et al.*, 2009; Helms *et al.*, 2010). The variations in iron concentrations ([Fe]) of pea seeds, which range from 23 to 105 $\mu\text{g g}^{-1}$ dry weight (DW) depending on the cultivar (White and Broadley, 2005), open up possibilities of Fe increase via breeding programs. Different plant traits have been proposed to account for this variability between legume cultivars. In soybean, genome wide association strategies (GWAS) identified

quantitative trait loci (QTL) associated with IDC and underlined the multigenic character of this phenomenon. This approach also stressed the determinant influence of environmental factors on the plant ionome (Mamidi *et al.*, 2011, 2014). In pea, DNA markers determining the mineral status of pea seeds have been identified and the effect of the plant's field environment on the seed contents of Fe and other minerals has also been evidenced (Ma *et al.*, 2017). Along with further progress in plant genetics and physiology, an increased understanding of these complex plant-environment interactions is therefore required.

Siderophore-mediated iron uptake by microorganisms has long been shown to contribute to plant nutrition under limiting conditions (Crowley *et al.*, 1988; Crowley and Wang, 1991; Bar-Ness *et al.*, 1992). More particularly Fe-pyoverdines, siderophores produced by fluorescent pseudomonads chelated to iron, are able to provide iron to strategy I and strategy II plants more efficiently than synthetic ferric chelate (Fe-EDTA) (Vansuyt *et al.*, 2007; Jin *et al.*, 2010; Shirley *et al.*, 2011).

We therefore propose that further attention should be given to the contribution of the rhizosphere microbiota to plant iron nutrition. Indeed, protein families related to siderophore production were reported to be increased in root- and rhizosphere-associated bacterial taxa (Bulgarelli *et al.*, 2015). More specifically, pseudomonad populations and their corresponding siderophores in the tobacco rhizosphere have been shown to differ according to iron nutrition of the plant genotype (wild type tobacco vs mutant overexpressing ferritin) (Robin *et al.*, 2006). These results showed that plants, closely related but distinguished by traits regarding iron nutrition, can differently impact specific members of the rhizosphere microbiota and consequently the pvd's produced which in turn can differently impact the health of the host-plant (Robin *et al.*, 2007). Model pyoverdines were shown to promote plant iron nutrition but very few of them have been tested for their impact on plant iron nutrition, even though pyoverdines are known to be highly diverse, with *c.a.* 100 different structures described so far, and to differ in their activities (antagonism against fungal phytopathogens, induction of plant defense reactions) (Robin *et al.*, 2007; van Loon *et al.*, 2008; Cézard *et al.*, 2015).

As regards pea iron status and ionome, the question arises as to whether the promotion of iron nutrition can vary with plant genotype and pvd type and whether the ionome can be modified since plant Fe status appears to influence the concentration of other elements (Cohen *et al.*, 1998; Baxter *et al.*, 2008; Maillard *et al.*, 2016). We hypothesized that (i) distinct

pvds could differently impact pea iron status and ionome and that (ii) different pea genotypes could be differently impacted by pvds. To test these hypotheses, we compared *in vitro* the effects of three distinct pvds on two pea cv. differing in their resistance to IDC (S, susceptible; T, tolerant) and the effect of inoculating a model strain producing one of the three pvds tested, and its pvd- mutant.

3. Materials and methods

3.1. Microbial strains and culture conditions

Pseudomonas fluorescens C7R12 (Eparvier *et al.*, 1991; Lemanceau and Alabouvette, 1991) is a model strain already used to investigate the effects of its siderophore pyoverdine (pvdC7R12) on plant iron nutrition (Vansuyt *et al.*, 2007; Shirley *et al.*, 2011; Trapet *et al.*, 2016). Its pyoverdine-minus mutant PL1 (mutant pvd-), had previously been obtained and used to assess pyoverdine contribution to bacterial competitiveness and plant iron nutrition (Mirleau *et al.*, 2001; Landa *et al.*, 2002; Trapet *et al.*, 2016). *Pseudomonas* strains D4214 and B426, isolated from the rhizosphere of pea cv. (cultivar) Dexter and Balltrap respectively, (see below) were chosen because of the high representation of their respective pyoverdines (as identified by isoelectric focusing according to Meyer *et al.*, 2008, data not shown) in the corresponding rhizospheres. *Pseudomonas* strains were grown routinely on King's medium B (KBM) (King *et al.*, 1954) or in KBM broth at 25°C.

3.2. Pyoverdine purification and Ferri-pyoverdine preparation

Pyoverdines pvdC7R12 from *P. fluorescens* C7R12, pvd2S from *Pseudomonas* sp. D4214, and pvd1T from *Pseudomonas* sp. B426 were obtained from cultures grown in succinate medium (Meyer and Abdallah, 1978) at 25°C with shaking at 200 rpm for 72 h then extracted from bacterial supernatants following the purification protocol previously described by Hartney *et al.* (2013). Briefly, the supernatants were passed through a column of Amberlite XAD-4 before elution with 100% methanol and drying. A second chromatography step was performed carried out in a column of LiChroprep RP-18 rinsed with EDTA and then acidified water (pH 4.0) before elution of the pyoverdines with 80% methanol followed by their concentration and freeze-drying prior to storage at 4°C in the dark. Ferripyoverdines (Fe-pyoverdine or Fe-pvd) were obtained by mixing the purified pyoverdines with inorganic FeCl₃

Table S1. Physicochemical characteristics of the Montardoise soil in which two pea cultivars, tolerant (T) and susceptible (S) to iron chlorosis, were grown under field conditions. Four bulk soil samples were analyzed independently. Soil analyses were performed commercially by the INRA Laboratory of Soil Analysis, Arras, France (Fulfils the requirements of the standard NF EN ISO/IEC 17025).

Soil characteristics			Mean (n=4)	± SD*
	pH		8.27	0.083
Granulometry	clays (< 2µm)	g/kg	287.25	12.447
	fine silts (2/20 µm)	g/kg	297.50	10.472
	coarse silts (50/200µm)	g/kg	139.00	2.708
	fine sands (50/200µm)	g/kg	91.00	0.816
Miscellaneous	coarse sands (200/2000µm)	g/kg	185.25	11.087
	organic carbon	g/kg	19.45	1.511
	total nitrogen	g/kg	2.29	0.150
	total CaO ₃	g/kg	641.25	22.292
Cobaltihexamine Exchangeable (ICP-AES/EAF)	organic matter	g/kg	33.68	2.613
	C/N		8.50	0.332
	Phosphorus (P ₂ O ₅) (Joret-Hebert)	g/kg	0.23	0.026
	Phosphorus (P ₂ O ₅) (Olsen)	g/kg	0.07	0.009
	CEC Metson	cmol/kg	11.13	0.499
	CEC cobaltihexamine	cmol/kg	15.68	0.922
	Calcium	cmol/kg	16.88	0.690
	Magnesium	cmol/kg	0.59	0.028
	Sodium	cmol/kg	0.03	0.002
	Potassium	cmol/kg	0.96	0.103
EDTA Extractable (ICP-AES)	Iron	cmol/kg	nd	nd
	Manganese	cmol/kg	nd	nd
	Aluminium	cmol/kg	nd	nd
	Copper	mg/kg	2.09	0.086
DTPA Extractable (ICP-AES)	Iron	mg/kg	4.97	0.215
	Manganese	mg/kg	9.82	2.009
	Zinc	mg/kg	6.36	0.679
Tamm method (ICP-AES)	Copper	mg/kg	1.30	0.074
	Iron	mg/kg	10.32	0.362
	Manganese	mg/kg	7.67	1.236
Merha-Jackson method (ICP-AES)	Zinc	mg/kg	3.98	0.350
	Silicium	g/100g	0.03	0.003
	Aluminium	g/100g	0.16	0.013
Total elements (HF - ICP-AES)	Iron	g/100g	0.08	0.006
	Silicium	g/100g	0.06	0.004
	Aluminium	g/100g	0.11	0.005
Total elements (HF - ICP-AES)	Iron	g/100g	0.53	0.028
	Aluminium	g/100g	2.10	0.129
	Calcium	g/100g	25.33	1.069
	Iron	g/100g	1.02	0.064
	Potassium	g/100g	0.54	0.030
	Magnesium	g/100g	0.25	0.009
	Manganese	mg/100g	568.50	16.381
	Sodium	g/100g	0.12	0.006
	Phosphorus	g/100g	0.29	0.010
	Sulfur	mg/kg	479.25	17.385

*. SD: standard deviation; ICP-AES; Inductively coupled argon plasma - atomic emission spectroscopy; EAF. Electric arc furnace; HF. complete solubilization in hydrofluoric acid.

at a molar ratio of 1:1. Concentrated Fe-pyoverdine solutions (600 μM) were prepared, filtered, sterilized and stored at 4°C in the dark.

3.3. *Plant growth conditions and sampling*

Two cultivars of *Pisum sativum*, Dexter and Balltrap, were chosen for their contrasting tolerance to iron deficiency chlorosis (IDC) in field conditions: Balltrap being tolerant and Dexter susceptible (P. Declerck, personal communication) as confirmed in a large-scale cohort study which compared field and greenhouse results (PersPEAcase RAGT-INRA projet P. Declerck, C. Jeudy & C. Salon; personal communication). These two cultivars are hereafter indicated T for tolerant (Balltrap) and S for susceptible (Dexter).

Field experiment. A field experiment was performed in a calcareous loam soil (Montardoise, France) with a low extractable iron content (DTPA-Fe = $10.3 \pm 0.34 \text{ mg kg}^{-1}$) and a high pH (8.27 ± 0.08 in water) (main soil characteristics are presented in **Supplementary Table S1**). For each cultivar, four plots 1 x 5 m in size were sown at the beginning of October 2016 (120 plants per m^{-2}). Visual chlorosis scores ranging from 1 to 9 (1, no yellowing; 3, mild yellowing; 5, moderate chlorosis; 7, severe chlorosis; and 9, severe chlorosis and necrosis) were recorded three times per plot after 22 weeks and 24 (flowering time) weeks. At weeks 24 (flowering time) and 33 (harvest time), five plants were randomly sampled per plot and pooled. The shoots and roots of these samples were separated. Roots were washed twice in 100 ml of sterile milliQ water and all nodules were removed. Shoots and roots were oven-dried separately at 60°C to constant weight (dry weight, DW). At harvest time, the seeds yielded by the samples were collected and dried separately.

In vitro bioassays. Iron supplementation and strain inoculation bioassays were performed. Seeds of tolerant and susceptible cultivars, originating from the above field experiments, contained similar amounts of iron (S, $9.45 \pm 1.86 \mu\text{g}$ per seed and T, $10.80 \pm 1.55 \mu\text{g}$ per seed; $F=1.241$, $p=0.307$). After surface sterilization by gentle shaking in 70% ethanol for 5 min and in calcium hypochlorite (1%) for 15 min, the seeds were then rinsed successively three times for 5 min in sterile demineralized water. They were then soaked in sterile demineralized water for 2 hours and germinated in the dark at room temperature in sterile Petri dishes containing ash-less sterilized filter paper sheets impregnated with demineralized water. One germinated seed was put on an agar slant tube loosely capped with gauze-wrapped non-absorbent cotton wool (day 1) which allowed the shoots to grow outwards. The agar slant tubes with germinated seeds were covered with opaque black plastic to protect the roots from light and placed in a growth chamber under a 16 hours photoperiod ($300 \mu\text{mol m}^{-1} \text{ s}^{-1}$; 23°C/20°C). The

agar slant tube (diameter, 2 cm; height, 15 cm) contained 30 mL of Hoagland medium (pH=6) (5 mM KH_2PO_4 and $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$, 2,5 mM KNO_3 , 1 mM MgSO_4 , 50 μM H_3BO_3 , 5 μM MnSO_4 , 15 μM $\text{ZnSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$, 3 μM $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$, 2.5 μM $\text{KI}(\text{H}_2\text{O})_7$ et $\text{CuSO}_4 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$) solidified with 15 g L^{-1} of agar (Sigma A1296 agar, Sigma-Aldrich, St. Quentin Fallavier, France). The residual iron in the agar medium was $12.52 \pm 0.84 \mu\text{M}$ (corresponding to $0.7 \pm 0.05 \text{ mg kg}^{-1}$) as measured on three dried samples (see below for method).

In the Fe-pyoverdine supplementation bioassays, on day 7, plants were supplemented with 8 mL of diluted (1/4) Hoagland's solution with or without Fe. The treatments were as follows: 0 Fe (non-supplemented), Fe-EDTA (15 μM), Fe-pvdC7R12 (15 μM), Fe-pvd1T (15 μM), and Fe-pvd2S (15 μM). Six plants were harvested per treatment on day 24 and pooled in pairs.

In the bacterial inoculation bioassays, Hoagland's agar for use in bacterial inoculation bioassays was supplemented with Fe-EDTA (1 μM). On day 1, plants were (i) inoculated with C7R12 (WT pvd+) or with PL1 its mutant pvd- (10^7 colony-forming units, CFU, per tube) or (ii) non-inoculated, i.e., supplemented with a volume of sterile water equivalent to that of the inoculants. Nine plants were harvested per treatment and pooled in threes.

The shoots and roots of plants grown in the bioassays were oven dried separately at 60°C to constant weight.

3.4. Determination of the ionic composition of pea plants

Dry samples were ground into fine powder using a Retsch mixer mill mm400 homogenizer (Retsch, Eragny, France). The concentrations of 13 elements (B, Na, Mg, P, S, K, Ca, Mn, Fe, Co, Cu, Zn, Mo) were measured by High Resolution Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry (HR ICP-MS, Thermo Scientific, Element 2TM, Bremen, Germany) following microwave acid sample digestion as previously described by Maillard *et al.* (2016) and modified as follows. All samples were spiked with two internal-standard solutions of gallium and rhodium for final concentrations of 5 and 1 $\mu\text{g l}^{-1}$, respectively, diluted to 50 ml with Milli-Q water to obtain solutions containing 2.0% (v/v) of nitric acid, and then filtered at 0.45 μm using a teflon filtration system (Digifiltre, SCP Science, Villebon-sur-Yvette, France).

3.5. Extraction, separation and relative quantification of seed proteins

Total soluble proteins were extracted from four seed samples, each consisting of 30 dry mature seeds per experimental treatment, using 500 μl of the urea/thiourea buffer for 10 mg

of seed powder, as previously described (Gallardo *et al.*, 2007). For each seed sample, 10 µg proteins were separated by one-dimensional electrophoresis (1-DE) in a 12% sodium-dodecyl sulfate polyacrylamide gel using the XCell4 *Surelock*TM Midi-Cell system (Life Technology, Illkirch, France) and stained with Coomassie Blue R250. Image acquisition was performed using the Odyssey Infrared Image System scanner (LICOR Biosciences, Lincoln, NE) with an intensity of 7.5 and a resolution of 169 µm. Protein band detection and quantification were performed using Phoretix 1D (v11.2, TotalLab Limited, Newcastle, UK). The quantitative data for each well were normalized by dividing the volume of each protein band by the total band volume. The molecular weight, in kilodaltons (kDa), of each protein band was calculated using the pre-stained low-range protein ladder (Bio-Rad, Marnes-la-Coquette, France). Protein annotation was performed by comparison with previously established 1-DE maps of pea seed proteins (Henriet *et al.*, 2019).

3.6. Data analyses

One-way ANOVA was used for all comparisons (i.e. roots, shoots, whole plants and seed biomasses; visual IDC scores; iron concentration; concentrations of other elements; root:shoot ratio of iron concentration, [Fe] R:S ratio; protein band volume to total protein volume; percentages of increase in iron concentration). ANOVA assumptions were verified through Shapiro-Wilks test for normality of distributions and Bartlett's test for homogeneity of variance. When ANOVA assumptions were not met, a Kruskal-Wallis test was performed as indicated in the results presentation. The [Fe] R:S ratio and increase (%) of iron concentration were subjected to arsine transformation prior to statistical analysis. The percentage increase of iron concentration after supplementation with Fe-EDTA or Fe-pyoverdine (pvdC7R12, pvd1T, pvd2S) was calculated using the formula: $[(\text{[Fe] of supplemented sample} - \text{[Fe] of corresponding non-supplemented control}) / (\text{[Fe] of corresponding non-supplemented control})] \times 100$; where [Fe] is the iron concentration expressed in g kg⁻¹. A two-way ANOVA was applied in bacterial inoculation bioassays to assess the significance of the effects of the cultivar and of bacterial inoculation on the biomass and iron concentration of roots, shoots and the whole plant grown *in vitro*. Data were analysed using R studio version 1.1.456 software and the stats (3.4.2) package.

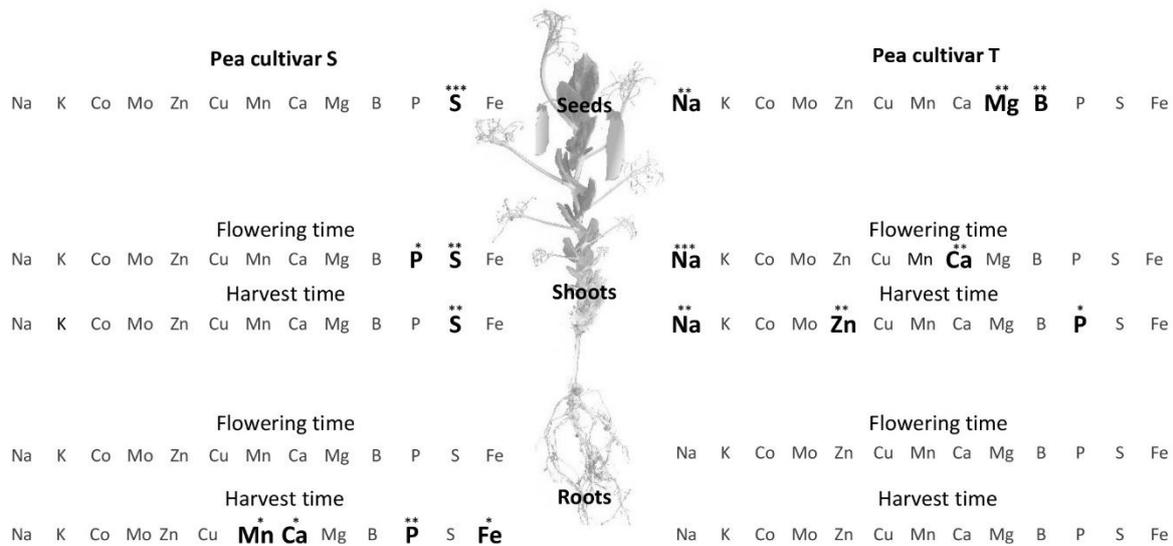


Figure 1. Comparison of elemental concentration in two pea cultivars, tolerant (T) and susceptible (S) to iron chlorosis, grown in a calcareous loam soil under field conditions (n=4). Bold characters highlight those elements for which the concentrations were significantly higher in one cultivar, as compared to the other, within a same plant compartment and at a same sampling date. ANOVA p-value: *, p<0.05; **, p<0.01; ***, p<0.001. Data regarding the element compositions of mature seeds are available in supplementary figure S2A.

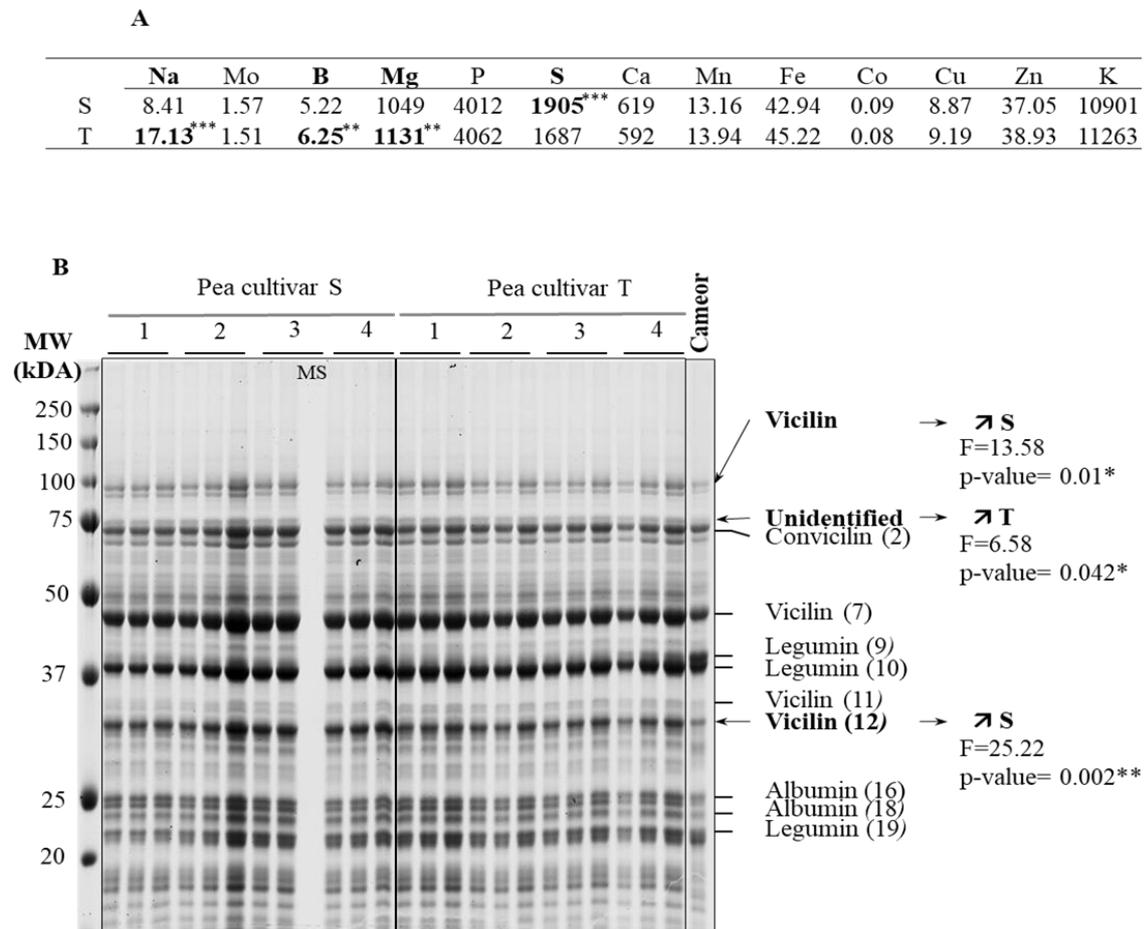


Figure S2. Comparison of mature seeds from a susceptible, S, and a tolerant, T, pea cultivar grown in a calcareous loam soil under field conditions. (A), Element compositions of mature seeds of pea cv. S and pea cv. T, mean value (N=3) in mg kg⁻¹. Bold characters highlight those elements for which the concentrations in the seeds were significantly higher in one cultivar as compared to the other. One-way ANOVA p-values: *, p<0.05; **, p<0.01; ***, p<0.001. (B), Comparison of protein compositions of mature seeds from both pea cultivars. Pea cv. Cameor was used as a reference for protein band annotation. The numbers in brackets refer to protein band identification as defined by Henriët *et al.*, (2019). Bold names highlight proteins found in higher amounts in one cv. (indicated to the right of an up-pointing arrow together with corresponding ANOVA F and p-values) than in the other. MS, Missing sample.

4. Results

4.1. Pea growth, seed yield, iron concentration, ionome in S and T cultivars cultivated under field conditions

Although shoot mass (per plant DW: S, 4.14 ±0.49 g and T, 4.45 ±0.40 g; F=1.031, p=0.349) and seed yield (S, 7.4 ±0.85 t ha⁻¹ and T, 7.6 ±1.17 t ha⁻¹; F=0.168, p=0.696) were higher in T than in S at harvest, these differences were not significant. Chlorosis symptoms, as indicated by the visual IDC score, were significantly higher in S than in T at the two recording dates, i.e., week 22 (S, 4.4±0.64 and T, 1.2±0.15; F=80.77, p=0.003) and during the flowering period (week 24) (S, 2.2±0 and T, 1.2±0.15; F=82.371, p=0.003).

At harvest, the iron concentration was significantly higher in S roots (S, 541.24±83.11 µg g⁻¹ DW and T roots, 422.95±34.92 µg g⁻¹ DW; F=6.888, p=0.039), leading to a significantly higher root:shoot iron concentration ratio in S than in T ([Fe] R:S ratio). The S and T cultivars also differed in their concentrations of other ions (**Figure 1**). Root manganese ([Mn]), calcium ([Ca]), and phosphorus ([P]) concentrations were significantly higher in S than in T at harvest time (**Figure 1**), and the shoot and seed sulfur concentrations ([S]) were higher in S than in T at harvest and also at flowering time. In contrast, the shoot sodium concentration ([Na]) was significantly higher in T, at both sampling dates, and the seed magnesium ([Mg]) and boron ([B]) concentrations significantly higher in T at harvest time (**Figure 1**).

The total soluble protein content of mature seeds did not differ between the two cultivars (S, 32% ±0.05 and T, 33% ±0.04; F=0.034, p=0.861), and their protein compositions varied only slightly, with a higher relative abundance of two proteins annotated as vicilins (7S globulins) (+21% for each) in S, and of an unidentified protein (+16%) in T (**Supplementary figure S2**).

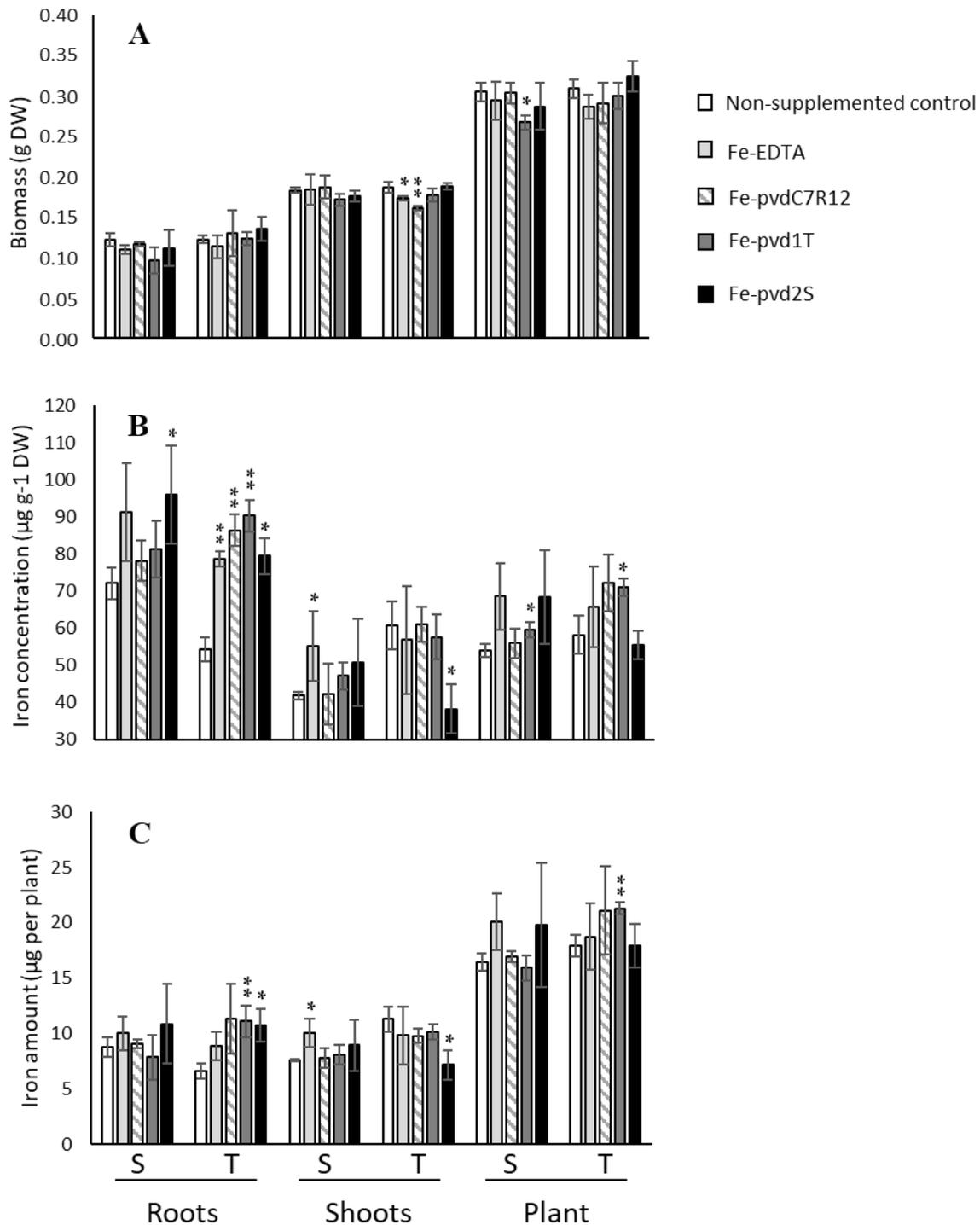


Figure 2. Effect of iron supplementation in the form of three ferripyoverdines, Fe-pvdC7R12, Fe-pvd1T, and Fe-pvd2S on (A) biomass, (B) iron concentration and (C) iron content in two pea cultivars, tolerant (T) and susceptible (S) to iron chlorosis (n=3). Error bars represent the s.d. of the mean. P value was calculated using one-way ANOVA between the supplementation treatment and the non-supplemented control within a same plant compartment and in a same pea cultivar. *, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$.

4.2. *Impact of ferrisiderophores on pea growth, development, iron content and ionome in S and T cultivars*

Neither Fe-pvds nor Fe-EDTA had a significant impact on plant growth, except for plant biomass that decreased in the S cultivar in the presence of Fe-pvd1T and shoot biomass that decreased in T in the presence of Fe-pvdC7R12 and Fe-EDTA (**Figure 2A**).

S and T [Fe] differed significantly in the absence of supplements (**Figure 2B**). [Fe] was significantly higher in S ($72.12 \pm 4.29 \mu\text{g g}^{-1} \text{DW}$) than in T roots ($54.31 \pm 4.79 \mu\text{g g}^{-1} \text{DW}$) ($F=11.237$, $p=0.028$), but higher in T shoots ($60.76 \pm 9.81 \mu\text{g g}^{-1} \text{DW}$) than in S shoots ($41.85 \pm 1.04 \mu\text{g g}^{-1} \text{DW}$) ($F=16.968$, $p=0.015$), resulting in a significantly higher [Fe] R:S ratio in S (1.72 ± 0.12) than in T (0.91 ± 0.21) ($F= 28.752$, $p=0.006$). The [Fe] R:S ratios are presented in **Supplementary Table S3** (next page). Similar trends were recorded for total iron content (**Supplementary Table S4** in next page).

The impact of supplementation on plant [Fe] differed significantly depending on the pvds (**Figure 2**). Supply of Fe-pvd1T, from a T rhizosphere strain, significantly increased the [Fe] in T roots compared to the non-supplemented controls, and this increase was also significantly higher than in roots of plants supplied with Fe-EDTA ($F=8.492$, $p=0.043$). Other Fe-pvds (Fe-pvdC7R12 and Fe-pvd2S) also significantly increased T [Fe] roots compared to the non-supplemented control roots.

Fe-pvd1T was the only Fe-pvd that increased plant total iron content in T compared to the non-supplemented control plants (T, $21.31 \pm 0.51 \mu\text{g}$ per plant and non-supplemented control $17.94 \pm 0.99 \mu\text{g}$ per plant; $F=27.532$, $p=0.006$) (**Figure 2C**). Fe-pvd1T also significantly increased [Fe] in S and T whole plants (**Figure 2B**). Fe-pvd2S had a negative effect on T shoot [Fe] (**Figure 2B**) but increased that of S roots. None of the Fe-pvds impacted [Fe] in S shoots which was only significantly increased by Fe-EDTA (**Figure 2B**).

Table S3. Root:shoot ratios of iron concentration, [Fe] R:S, observed in two pea cultivars, tolerant (T) and susceptible (S) to iron chlorosis, grown *in vitro* and (A) supplemented or not with Fe-EDTA, Fe-pvdC7R12, Fe-pvd1T or Fe-pvd2S, or (B) supplemented with Fe-EDTA (1 μ M) and inoculated or not with the wild type strain of *P. fluorescens* C7R12 (WT pvd+) and its PL1 pvd- mutant (Mutant pvd-). One-way ANOVA F-value and p-value were calculated between the supplementation treatment and the corresponding control (non-supplemented or non-inoculated). Bold characters highlight significant differences. *, p<0.05.

A				
Pea cultivar	Treatments	[Fe] R:S	ANOVA [†]	
			F-value	p-value
S	Non-supplemented	1.72 \pm 0.12		
	Fe-EDTA	1.67 \pm 0.27	0.10	0.76
	Fe-pvdC7R12	1.90 \pm 0.43	0.41	0.56
	Fe-pvd1T	1.74 \pm 0.31	2.54	0.19
	Fe-pvd2S	1.93 \pm 0.37	0.88	0.40
T	Non-supplemented	0.91 \pm 0.21		
	Fe-EDTA	1.55 \pm 0.70	2.54	0.19
	Fe-pvdC7R12	1.42 \pm 0.06	13.90	0.02*
	Fe-pvd1T	1.60 \pm 0.31	10.36	0.03*
	Fe-pvd2S	2.21 \pm 0.77	9.83	0.04*

B				
Pea cultivar	Treatments	[Fe] R:S	ANOVA [†]	
			F-value	p-value
S	Non-inoculated	1.88 \pm 0.21		
	WT pvd+	1.87 \pm 0.37	0.01	0.94
	Mutant pvd-	1.72 \pm 0.51	0.30	0.61
T	Non-inoculated	1.79 \pm 0.13		
	WT pvd+	1.40 \pm 0.01	18.24	0.01*
	Mutant pvd-	1.47 \pm 0.12	9.17	0.04*

[†], [Fe] R:S ratio was subjected to arsine transformation prior to one-way ANOVA.

Table S4. Comparison of iron concentration and iron content between two pea cultivars tolerant (T) and susceptible (S) to iron chlorosis grown without iron supplementation (Non-supplemented control).

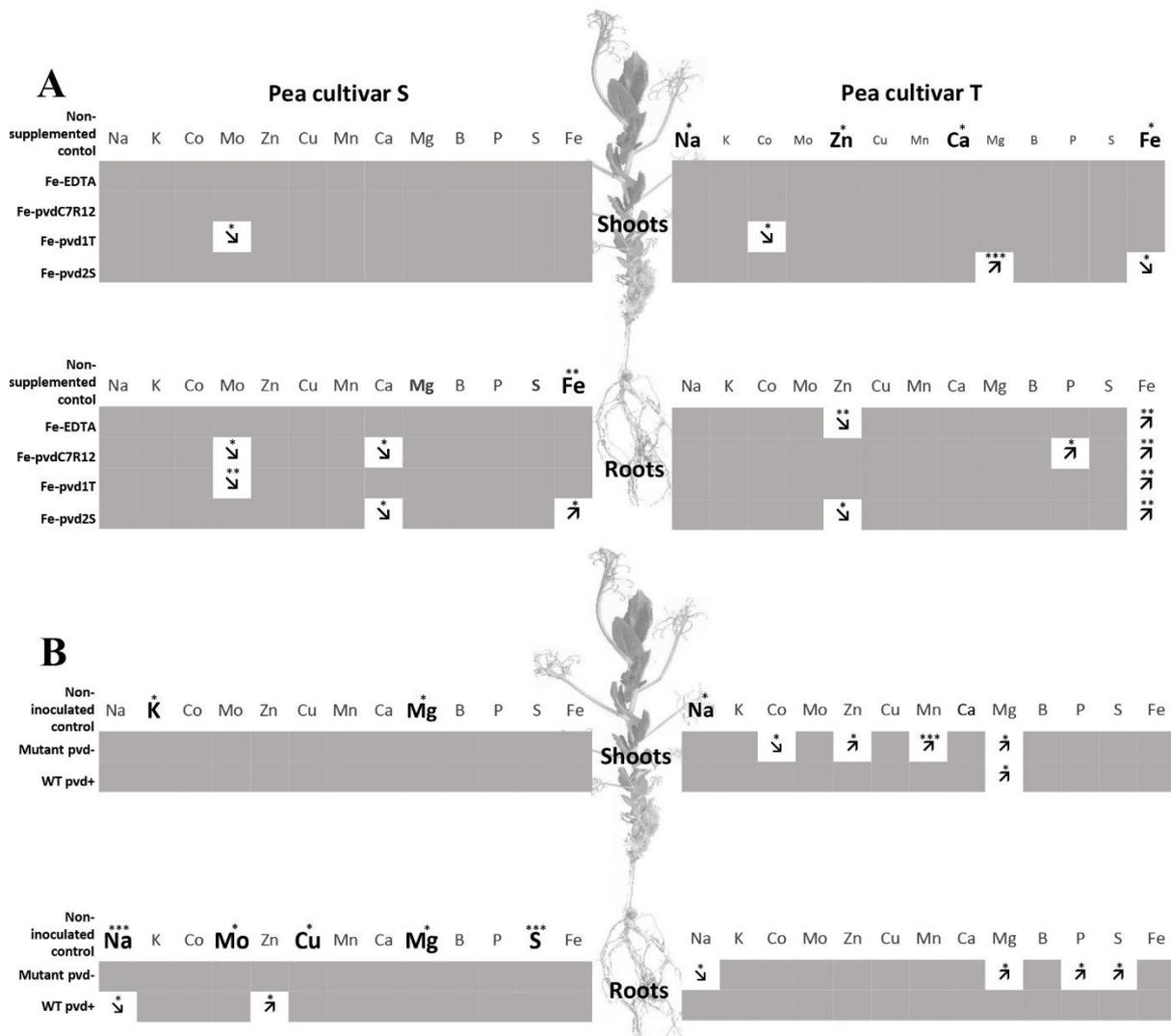
Pea cultivars	Iron concentration ($\mu\text{g g}^{-1}$ DW)			Iron content (μg per plant DW)		
	Roots	Shoots	Whole plant	Roots	Shoots	Whole plant
S	72.12 \pm 4.29 [†]	41.85 \pm 1.04	53.96 \pm 1.78	8.79 \pm 0.89	7.66 \pm 0.10	16.45 \pm 0.80
T	54.31 \pm 4.79	60.76 \pm 9.81	58.72 \pm 5.23	6.63 \pm 0.67	11.31 \pm 1.53	17.94 \pm 0.99
ANOVA						
F-value	22.381	12.680	1.814	11.257	16.960	4.120
p-value	0.009**	0.023*	0.249	0.028*	0.014*	0.112

[†], Mean \pm SD; *, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$.

Table 1. Compared effect of Fe-EDTA or Fe-pyoverdine (Fe-pvdC7R12, Fe-pvd1T and Fe-pvd2S) iron supplementation on the increased percentage iron concentration in two pea cultivars, tolerant (T) and susceptible (S) to iron chlorosis.

Pea cultivar	Fe-EDTA			Fe-pvdC7R12			Fe-pvd1T			Fe-pvd2S		
	Roots	Shoots	Whole plant	Roots	Shoots	Whole plant	Roots	Shoots	Whole plant	Roots	Shoots	Whole plant
S	26.4 [†] (±18.31)	32.01 (±22.59)	27.12 (±16.6)	8.43 (±7.37)	7.92 (±13.71)	4.43 (±6.64)	12.66 (±10.54)	12.48 (±8.74)	10.44 (±4)	33.09 (±18.41)	22.48 (±26.61)	26.66 (±23.56)
T	44.9 (±5.88)	8.03 (±13.91)	15.33 (±14.8)	59.13 (±10.59)	4.25 (±5.58)	24.20 (±13.11)	66.35 (±11.31)	3.21 (± 5.56)	22.01 (±4.09)	46.19 (±12.31)	0	0
ANOVA, KW p-value	0.165	0.160	0.410	0.004**	0.961	0.080*	0.005**	0.168	0.024*	0.355	<i>0.157</i>	0.026*
F/H	2.871	2.955	0.843	32.687	0.002	5.428	29.378	2.814	12.292	1.091	<i>3.019</i>	<i>11.790</i>

†, Mean percentage (±SD). ., p<0.1; *, p<0.05; **, p<0.01. When ANOVA assumptions were not met, a Kruskal-Wallis (KW) test was performed; KW p-value and H are indicated in italics.



Impact of Fe-pvd supplementation on plant [Fe] differed significantly depending on the pea cultivar (**Table 1**). Promotion of [Fe] by Fe-pvd2S, derived from a strain isolated in the S rhizosphere, was significantly greater in S than in T, whereas Fe-pvd1T from a strain isolated in the T rhizosphere, and Fe-pvdC7R12 increased [Fe] to a significantly greater extent in T plants, especially their roots. In the T cultivar, Fe-pvds, but not Fe-EDTA, significantly increased the [Fe] R:S ratio compared to the non-supplemented control (**Supplementary Table S3**). In the S cultivar, this [Fe] R:S ratio was not significantly modified by any of the Fe-pvds or by Fe-EDTA (**Supplementary Table S3**).

When non-supplemented, the S and T cultivars also differed in their contents of other ions. As demonstrated in the field experiments, the ionomes varied according to the Fe-pvds and cultivars. Shoot [Na] was significantly higher in the T cultivar (indicated by bold letters in **Figure 3A**). Zinc ([Zn]) and [Ca] concentrations were also higher in T than in S shoot. Fe-pvdC7R12 had a negative effect on molybdenum ([Mo]) and [Ca] concentrations in S roots and a positive effect on [P] in T roots (indicated by arrows in **Figure 3A**). Fe-pvd1T induced a decrease of [Mo] in S shoots and roots and of cobalt concentration ([Co]) in T shoots. Finally, Fe-pvd2S increased [Mg] in T shoots and decreased [Ca] in S roots and [Zn] in T roots.

Figure 3. Comparison of element concentrations in two pea cultivars, tolerant (T) and susceptible (S) to iron chlorosis, grown *in vitro* (n=3), **(A)** supplemented or not with Fe-EDTA, Fe-pvdC7R12, Fe-pvd1T or Fe-pvd2S, or **(B)** supplemented with Fe-EDTA (1 μ M) and inoculated or not with the wild type strain of *P. fluorescens* C7R12 (WT pvd+) and its PL1 pvd- mutant (Mutant pvd-). Bold characters highlight those elements for which the concentrations were significantly higher in one cultivar, as compared to the other, within a same plant compartment, in the non-supplemented plants for **(A)**, and in the non-inoculated plants for **(B)**. Arrows indicate increase or decrease of element concentration in comparison to the corresponding control within a same plant compartment and in a same cultivar after iron supplementation for **(A)**, or bacterial inoculation for **(B)**. ANOVA p-values. *, p<0.05; **, p<0.01; ***, p<0.001.

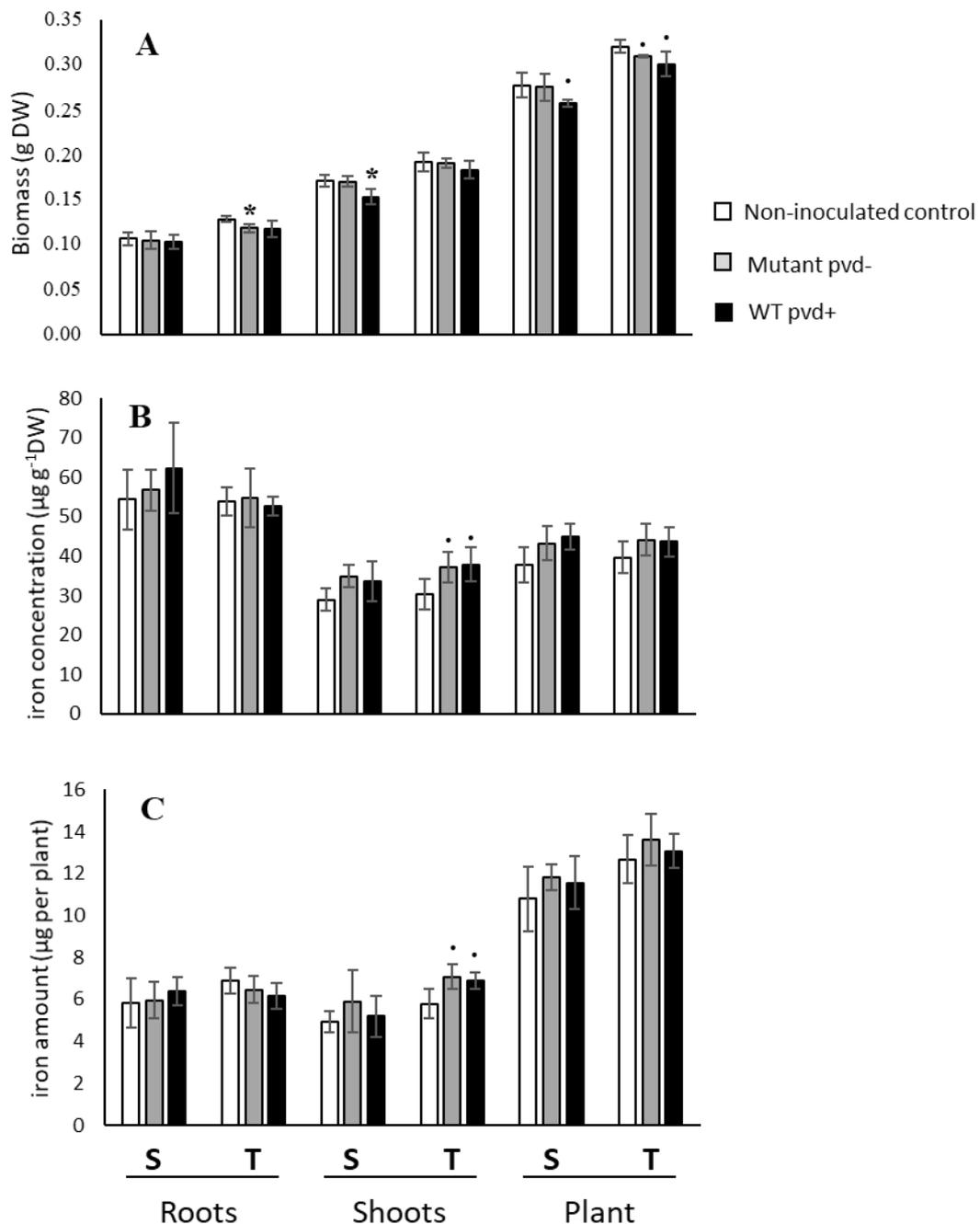


Figure 4. Effect of inoculation of the wild type strain *P. fluorescens* C7R12 (WT pvd+) and of PL1 its pvd- mutant (Mutant pvd-) on (A) biomass, (B) iron concentration, and (C) iron content in two pea cultivars, tolerant (T) and susceptible (S) to iron chlorosis (n=3). Error bars represent the s.d. of the mean. P value was calculated using one-way ANOVA between the inoculation treatment and the non-inoculated control within a same plant compartment and in a same pea cultivar. *, p<0.1; **, p<0.05.

4.3. *Impact of Pseudomonas C7R12 and its pyoverdine-minus mutant on pea growth, development, iron content and ionome in S and T cultivars*

No significant interactions between the effects of cultivar and bacterial inoculation on plant growth were observed (roots $F=0.521$, $p=0.607$; shoot $F=0.706$, $p=0.513$; whole plant $F=0.415$, $p=0.670$) (**Figure 4**). Plant biomass was significantly higher in T than in S for all compartments (roots $F=21.238$, $p<0.001$; shoots $F=40.423$, $p<0.0001$) and bacterial inoculation negatively impacted the growth of shoots in both cultivars ($F=5.125$, $p=0.025$) and in the whole plants ($F=5.511$, $p=0.02$), but not in roots ($F=1.483$, $p=0.266$). Inoculation of C7R12 significantly decreased S shoot biomass ($F=8.656$, $p=0.042$) whereas its pvd- mutant significantly decreased that of root biomass in T ($F=7.758$, $p=0.049$) (**Figure 4**) but had no significant effect on S shoot biomass.

The iron concentrations in roots and shoots of non-inoculated cultivars (**Figure 4B**) did not differ significantly (roots, $F=0.018$, $p=0.899$; shoots, $F=0.240$, $p=0.650$).

The iron concentrations of inoculated cultivars did not differ either, except in T shoots which showed a substantially increased trend toward significance with both the WT strain and its pvd- mutant (WT pvd+, $F=5.081$, $p=0.081$; mutant pvd-, $F=7.14$, $p=0.056$) (**Figure 4B**). This bacterial effect on [Fe] in T shoots but not in roots led to a significant decrease of the [Fe] R:S ratio compared to that of the non-inoculated control (**Supplementary Table S3**).

The ionomes differed for non-inoculated peas, shoot [Na] being significantly higher in T than in S (**Figure 3B**). The impact of bacterial inoculation on pea ionomes depended on the cultivars and bacterial strains. In the S cultivar, the WT pvd+ strain decreased [Na] but increased [Zn] in roots. In the T cultivar, [Mg] was increased in shoots by WT and in both roots and shoots by the pvd- mutant. In this cultivar, the pvd- mutant increased [Co], [Zn], [Mn] and [Mg] in shoots and also induced a decrease of [Na] in the roots (**Figure 3B**). Bacterial inoculation did not impact the S shoot ionome.

5. Discussion

Promoting grain legume cultivation is expected to decrease the use of chemical inputs, especially nitrogen fertilizer, diversify the protein sources for human and animal consumption, and thereby contribute to an improved sustainability of food systems (Wezel *et al.*, 2014; Foyer *et al.*, 2016; Zander *et al.*, 2016; Rehman *et al.*, 2019). However, these developments require circumvention of the bottlenecks currently associated with legume cultivation, which include an optimization of iron nutrition, to permit sufficiently high yields and increase the seed iron content, this latter being especially important in the context of partial replacement of animal proteins by plant proteins. Thus, the aim of this study was to better understand the contribution of fluorescent pseudomonads and their pyoverdines to pea adaptation to iron deficiency. For that purpose, two cultivars differing in their tolerance of chlorosis (IDC) were compared for their growth, iron content and ionome in general, when cultivated in the open field and under iron stress conditions (calcareous soil), and in bioassays with iron supplements (Fe-EDTA, Fe-pvds) and bacterial inoculation (WT pvd+ or pvd-mutant).

In the open field experiment under iron stress conditions, chlorosis was recorded in the S cultivar but not in T. This chlorosis was associated with an increased iron content in S roots compared to T roots although the total iron content did not differ between T and S plants. This is in agreement with previous reports indicating differences in iron distribution but not in total iron content between susceptible and tolerant plants (Jelali *et al.*, 2010; Santos *et al.*, 2015). Nor was any difference observed in the shoot and seed biomass despite a slight difference in proteins composition. Collectively, this field experiment confirmed the difference in susceptibility to iron stress of the two cultivars S and T although their crop yield and seed quality (i.e. iron content) was comparable.

In vitro, in the absence of iron supplementation, no difference in whole-plant iron concentration was observed, but the distribution of iron within the plant differed between the two cultivars, the [Fe] R:S ratio being significantly higher in S than in T. This observation on young plants *in vitro* further confirmed the results obtained on mature plants in the field at harvest time which indicated differences in iron distribution between IDC tolerant and susceptible plants.

The contribution of pyoverdines to differential adaptation of the two pea cultivars to iron stress was further explored during *in vitro* bioassays. The ferripyoverdine Fe-pvd1T, as compared with Fe-EDTA, promoted root iron concentration in the tolerant cultivar (T). This confirms and extends to a new plant species and other pyoverdines results previously reported (Vansuyt *et al.*, 2007; Jin *et al.*, 2010; Shirley *et al.*, 2011). In the tolerant cultivar T, the impact of Fe-pvd1T and Fe-pvd2S on concentration and on total iron content in the shoots and whole plant was significantly different. In contrast, neither Fe-pvds differently impacted the concentration or the total amount of iron in the susceptible cultivar S. These results support our hypotheses that (i) distinct pvds could differently impact plant iron nutrition and (ii) that distinct plant genotypes could be differently impacted by pvds. They further suggest that differences between the S and T cultivar in valuing iron chelated to pyoverdines could possibly account for their different susceptibility to iron stress; this hypothesis is currently being tested. Comparison of the increased percentage of iron concentration induced by Fe supplements in the two pea cultivars showed that Fe-pvd1T was more favorable to iron nutrition in T whereas Fe-pvd2S had a more significant impact on S. This suggests that the two pvds produced by strains isolated from peas had a most favorable impact on the cultivar from which their producing strain originated. In the absence of iron supplementation, no difference was observed in the global whole-plant iron concentration but the distribution of iron within the plant differed between the two pea cultivars, the [Fe] R:S ratio being significantly higher in S than in T. This observation on young plants *in vitro* and on mature plants at harvest time in the field, is in agreement with previous reports of distinguishing traits between IDC tolerant and susceptible plants. The iron content of chlorotic peas was shown to be as high as in non-chlorotic peas indicating that iron homeostasis and distribution *in planta*, rather than iron acquisition, would be involved in tolerance to IDC (Barhoumi *et al.*, 2007; Jelali *et al.*, 2010; Yakop, 2012). This was also evidenced in soybean (Bloom *et al.*, 2011; Santos *et al.*, 2015). Our results also demonstrated that iron distribution *in planta* could be significantly impacted by *Pseudomonas* pyoverdines siderophores. Our results also revealed another distinction between the tolerant cultivar, T, and the susceptible cultivar, S. Indeed, after Fe-pvds supplementation a significant modification of iron distribution, as evaluated by the [Fe] R:S ratio, was only recorded in the tolerant cultivar, T.

Inoculation assays with the WT *pvd+* strain C7R12 and its *pvd-* mutant PL1 were performed to study the effects of the model pyoverdine *pvd*C7R12 produced *in situ* by the bacterium. Bacterial inoculation with WT *pvd+* and the mutant *pvd-* led to slight increases in shoot iron concentration. However, a significant modification of the [Fe] R:S ratio was observed, which again concerned the tolerant T cultivar, but not the susceptible S cultivar. This effect could not be ascribed to *pvd*C7R12 since WT *pvd+* and the *pvd-* mutant had a similar impact on plant iron status. Nevertheless, it shows that the strain C7R12 could modify pea iron status in T and confirms the greater sensitivity of iron distribution to microbial activity in the tolerant than in the susceptible cultivar. However, Fe-*pvd*s and microbial strains differently modified iron distribution in T. Several factors may account for this discrepancy. Since iron was present in limited amounts under *in vitro* conditions, a small amount of Fe-EDTA was added in order to avoid competition for iron between plant and bacteria. Although low, this Fe-EDTA supplementation of the agar medium modified the experimental conditions in such a way as to affect the iron status of the pea plants. Indeed, the differences observed between iron concentrations in roots and shoots of the S and T non-supplemented control plants were no longer detectable between S and T non-inoculated control plants. In addition to modifying pea iron status, these experimental conditions could also have hampered the synthesis and/or effect of the *pvd*. This could explain the lack of difference between the effect of the WT *pvd+* and the mutant *pvd-* on pea iron content. Moreover, besides pyoverdine, fluorescent pseudomonads synthesize secondary siderophores and many other compounds reported to affect plant development (Haas and Défago, 2005; Cornelis, 2010). In particular, in addition to secondary siderophores, strain C7R12 produces indole acetic acid and harbors a type III secretion system that may account for the effects of inoculation (Viollet *et al.*, 2017).

Our results also demonstrated that Fe-*pvd* supplementation modified the plant concentrations of ions other than iron. This is in agreement with previous reports that the plant ionome is closely linked to the plant's nutritional status (Cohen *et al.*, 1998; Maillard *et al.*, 2016). As observed for iron, the reported modifications varied with the *pvd*s and pea cultivars. This shows that microbial activity impacts elements, besides iron, that are essential for plant growth and development (e.g. P, S, Mn) and for the nutritional value of staple foods (e.g. Zn, Mg).

Interestingly, a higher concentration of shoot Na in T than in S was consistently observed in the field and *in vitro*, which was not altered by iron supplementation or bacterial inoculation. In *Arabidopsis thaliana*, the *AtHKT1;1* locus, encoding a sodium transporter, has been identified as a major factor controlling natural variation in leaf Na⁺ accumulation and a weak allele of *AtHKT1;1*, that drives elevated leaf Na⁺, has been linked to elevated salinity tolerance (Rus *et al.*, 2006; Baxter *et al.*, 2010). Since a correlation between greater tolerance to saline-alkaline stress and high efficiency of iron acquisition has been observed in rice (Li *et al.*, 2016), further analysis of leaf Na accumulation in relation to salinity and IDC tolerance in various peas cv. could be of interest.

Collectively, our results show for the first time that pyoverdines of fluorescent pseudomonads may impact positively iron nutrition in peas and, on an even broader scale, their elemental nutrition. They further stress the specificity of the corresponding interactions between pea cultivars and pseudomonads. Indeed, the iron nutrition of T cultivar benefited more than that of S from bacterial siderophores. Also, allocation of iron within the plant was modified by the bacteria and ferrisiderophores in T but not in S cultivar. These differences indicate that fluorescent pseudomonads and their pyoverdines impact more iron nutrition and allocation in T than in S; this would suggest that pseudomonads and pyoverdines could possibly account for cultivar differences in IDC tolerance. This hypothesis calls for taking better account the specificity of interactions between plant genotype and associated microorganisms in future attempts to promote plant iron nutrition. Experiments are undergoing to test these hypothesis and proposal.

6. Author contributions

SM and PL initiated the study. TL, PL and SM conceived, designed the experiments, analyzed the data and wrote the manuscript. TL, CC, and CB performed the experiments. CJ, CS, PD, provided expertise in pea genotypes and field experiments. KG contributed to analyses and interpretations of seed proteins, and AO and FL to those on plant ionome. All authors contributed to the discussion and approved the final manuscript.

7. Acknowledgements

This work was supported by the 'Conseil Régional de Bourgogne', and by the POSiTIF project of the Plant2Pro Carnot Institute. The authors are grateful to Delphine Aimé for helpful advice regarding 1-DE, and to Diana Warwick for correcting the English text.

8. References

- Barhoumi, Z., Rabhi, M., and Gharsalli, M. (2007). Effect of two nitrogen forms on the growth and iron nutrition of pea cultivated in presence of bicarbonate. *J. Plant Nutr.* 30, 1953–1965. doi:10.1080/01904160701700368.
- Bar-Ness, E., Hadar, Y., Chen, Y., Römheld, V., and Marschner, H. (1992). Short-term effects of rhizosphere microorganisms on Fe uptake from microbial siderophores by maize and oat. *Plant Physiol.* 100, 451–456. doi:10.1104/pp.100.1.451.
- Baxter, I., Brazelton, J. N., Yu, D., Huang, Y. S., Lahner, B., Yakubova, E., et al. (2010). A coastal cline in sodium accumulation in *Arabidopsis thaliana* is driven by natural variation of the sodium transporter AtHKT1. *PLoS Genet.* 6, e1001193. doi:10.1371/journal.pgen.1001193.
- Baxter, I. R., Vitek, O., Lahner, B., Muthukumar, B., Borghi, M., Morrissey, J., et al. (2008). The leaf ionome as a multivariable system to detect a plant's physiological status. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 105, 12081–12086. doi:10.1073/pnas.0804175105.
- Bloom, P. R., Rehm, G. W., Lamb, J. A., and Scobbie, A. J. (2011). Soil nitrate is a causative factor in iron deficiency chlorosis in soybeans. *Soil Sci. Soc. Am. J.* 75, 2233–2241. doi:10.2136/sssaj2010.0391.
- Briat, J.-F., Dubos, C., and Gaymard, F. (2015). Iron nutrition, biomass production, and plant product quality. *Trends Plant Sci.* 20, 33–40. doi:10.1016/j.tplants.2014.07.005.
- Bulgarelli, D., Garrido-Oter, R., Münch, P. C., Weiman, A., Dröge, J., Pan, Y., et al. (2015). Structure and function of the bacterial root microbiota in wild and domesticated barley. *Cell Host Microbe.* 17, 392–403. doi:10.1016/j.chom.2015.01.011.
- Cézard, C., Farvacques, N., and Sonnet, P. (2015). Chemistry and biology of pyoverdines, *Pseudomonas* primary siderophores. *Curr. Med. Chem.* 22, 165–186. doi:10.2174/0929867321666141011194624.
- Chen, Y., and Barak, P. (1982). Iron nutrition of plants in calcareous soils. *Adv. Agron.* 35, 217–240. doi:10.1016/S0065-2113(08)60326-0.
- Cohen, C. K., Fox, T. C., Garvin, D. F., and Kochian, L. V. (1998). The role of iron-deficiency stress responses in stimulating heavy-metal transport in plants. *Plant Physiol.* 116, 1063–1072. doi:10.1104/pp.116.3.1063.
- Cornelis, P. (2010). Iron uptake and metabolism in pseudomonads. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 86, 1637–1645. doi:10.1007/s00253-010-2550-2.
- Crowley, D. E., Reid, C. P., and Szanislo, P. J. (1988). Utilization of microbial siderophores in iron acquisition by oat. *Plant Physiol.* 87, 680–685. doi:doi.org/10.1104/pp.87.3.680.
- Crowley, D. E., and Wang, Y. C. (1991). Mechanisms of iron acquisition from siderophores by microorganisms and plants. *Plant Soil.* 130, 179–198. doi:doi.org/10.1007/978-94-011-3294-7_27.
- Eparvier, A., Lemanceau, P., and Alabouvette, C. (1991). Population dynamics of non-pathogenic *Fusarium* and fluorescent *Pseudomonas* strains in rockwool, a substratum for soilless culture. *FEMS Microbiol. Ecol.* 9, 177–184. doi:10.1111/j.1574-6941.1991.tb01750.x.
- Fourcroy, P., Sisó-Terraza, P., Sudre, D., Savirón, M., Rey, G., Gaymard, F., et al. (2014). Involvement of the ABCG37 transporter in secretion of scopoletin and derivatives by *Arabidopsis* roots in response to iron deficiency. *New Phytol.* 201, 155–167. doi:10.1111/nph.12471.

- Foyer, C. H., Lam, H.-M., Nguyen, H. T., Siddique, K. H. M., Varshney, R. K., Colmer, T. D., et al. (2016). Neglecting legumes has compromised human health and sustainable food production. *Nature Plants*. 2, 16112. doi:10.1038/nplants.2016.112.
- Gallardo, K., Firnhaber, C., Zuber, H., Hélicher, D., Belghazi, M., Henry, C., et al. (2007). A combined proteome and transcriptome analysis of developing *Medicago truncatula* seeds: evidence for metabolic specialization of maternal and filial tissues. *Mol. Cell Proteomics*. 6, 2165–2179. doi:10.1074/mcp.M700171-MCP200.
- Gildersleeve, R. R., and Ocumpaugh, W. R. (1989). Greenhouse evaluation of subterranean clover species for susceptibility to iron-deficiency chlorosis. *Crop Science*. 29, 949–951.
- Haas, D., and Défago, G. (2005). Biological control of soil-borne pathogens by fluorescent pseudomonads. *Nat. Rev. Microbiol.* 3, 307–319. doi:10.1038/nrmicro1129.
- Hansen, N. C., Hopkins, B. G., Ellsworth, J. W., and Jolley, V. D. (2006). “Iron nutrition in field crops,” in *Iron nutrition in plants and rhizospheric microorganisms*, eds. L. L. Barton and J. Abadia (Dordrecht: Springer Netherlands), 23–59. doi:10.1007/1-4020-4743-6_2.
- Hartney, S. L., Mazurier, S., Girard, M. K., Mehnaz, S., Davis, E. W., Gross, H., et al. (2013). Ferric-pyoverdine recognition by Fpv outer membrane proteins of *Pseudomonas protegens* Pf-5. *J. Bacteriol.* 195, 765–776. doi:10.1128/JB.01639-12.
- Helms, T. C., Scott, R. A., Schapaugh, W. T., Goos, R. J., Franzen, D. W., and Schlegel, A. J. (2010). Soybean iron-deficiency chlorosis tolerance and yield decrease on calcareous soils. *Agron. J.* 102, 492. doi:10.2134/agronj2009.0317.
- Henriet, C., Aimé, D., Térézol, M., Kilandamoko, A., Rossin, N., Combes-Soia, L., et al. (2019). Water stress combined with sulfur deficiency in pea affects yield components but mitigates the effect of deficiency on seed globulin composition. *J. Exp. Bot.* erz114. doi:10.1093/jxb/erz114.
- Hider, R. C., and Kong, X. (2010). Chemistry and biology of siderophores. *Nat. Prod. Rep.* 27, 637. doi:10.1039/b906679a.
- Ishimaru, Y., Suzuki, M., Tsukamoto, T., Suzuki, K., Nakazono, M., Kobayashi, T., et al. (2006). Rice plants take up iron as an Fe³⁺-phytosiderophore and as Fe²⁺. *Plant J.* 45, 335–346. doi:10.1111/j.1365-313X.2005.02624.x.
- Jelali, N., Wissal, M., Dell’orto, M., Abdelly, C., Gharsalli, M., and Zocchi, G. (2010). Changes of metabolic responses to direct and induced Fe deficiency of two *Pisum sativum* cultivars. *Environ. Exp. Bot.* 68, 238–246. doi:10.1016/j.envexpbot.2009.12.003.
- Jin, C. W., Li, G. X., Yu, X. H., and Zheng, S. J. (2010). Plant Fe status affects the composition of siderophore-secreting microbes in the rhizosphere. *Ann. Bot.* 105, 835–841. doi:10.1093/aob/mcq071.
- King, E. O., Ward, M. K., and Raney, D. E. (1954). Two simple media for the demonstration of pyocyanin and fluorescein. *J. Lab. Clin. Med.* 44, 301–307. doi:10.5555/uri:pii:002221435490222X.
- Kobayashi, T., and Nishizawa, N. K. (2012). Iron uptake, translocation, and regulation in higher plants. *Annu. Rev. Plant Biol.* 63, 131–152. doi:10.1146/annurev-arplant-042811-105522.
- Landa, B. B., Cachinero-Díaz, J. M., Lemanceau, P., Jiménez-Díaz, R. M., and Alabouvette, C. (2002). Effect of fusaric acid and phytoanticipins on growth of rhizobacteria and *Fusarium oxysporum*. *Can. J. Microbiol.* 48, 971–985. doi:10.1139/w02-094.
- Lemanceau, P., and Alabouvette, C. (1991). Biological control of fusarium diseases by fluorescent *Pseudomonas* and non-pathogenic *Fusarium*. *Crop Protection*. 10, 279–286. doi:10.1016/0261-2194(91)90006-D.

- Lemanceau, P., Bauer, P., Kraemer, S., and Briat, J.-F. (2009). Iron dynamics in the rhizosphere as a case study for analyzing interactions between soils, plants and microbes. *Plant Soil*. 321, 513–535. doi:10.1007/s11104-009-0039-5.
- Li, Q., Yang, A., and Zhang, W.-H. (2016). Efficient acquisition of iron confers greater tolerance to saline-alkaline stress in rice (*Oryza sativa* L.). *J. Exp. Bot.* 67, 6431–6444. doi:10.1093/jxb/erw407.
- Ma, Y., Coyne, C. J., Grusak, M. A., Mazourek, M., Cheng, P., Main, D., et al. (2017). Genome-wide SNP identification, linkage map construction and QTL mapping for seed mineral concentrations and contents in pea (*Pisum sativum* L.). *BMC Plant Biol.* 17, 43. doi:10.1186/s12870-016-0956-4.
- Mahmoudi, H., Koyro, H.-W., Debez, A., and Abdelly, C. (2009). Comparison of two chickpea varieties regarding their responses to direct and induced Fe deficiency. *Environ. Exp. Bot.* 66, 349–356. doi:10.1016/j.envexpbot.2009.03.013.
- Maillard, A., Etienne, P., Diquélou, S., Trouverie, J., Billard, V., Yvin, J.-C., et al. (2016). Nutrient deficiencies modify the ionic composition of plant tissues: a focus on cross-talk between molybdenum and other nutrients in *Brassica napus*. *J. Exp. Bot.* 67, 5631–5641. doi:10.1093/jxb/erw322.
- Mamidi, S., Chikara, S., Goos, R. J., Hyten, D. L., Annam, D., Moghaddam, S. M., et al. (2011). Genome-wide association analysis identifies candidate genes associated with iron deficiency chlorosis in soybean. *Plant Genome*. 4, 154–164. doi:10.3835/plantgenome2011.04.0011.
- Mamidi, S., Lee, R. K., Goos, J. R., and McClean, P. E. (2014). Genome-wide association studies identifies seven major regions responsible for iron deficiency chlorosis in soybean (*Glycine max*). *PLoS ONE*. 9, e107469. doi:10.1371/journal.pone.0107469.
- Meyer, J. M., and Abdallah, M. A. (1978). The fluorescent pigment of *Pseudomonas fluorescens*: biosynthesis, purification and physicochemical properties. *Microbiology*. 107, 319–328. doi:doi.org/10.1099/00221287-107-2-319.
- Meyer, J.-M., Gruffaz, C., Raharinosy, V., Bezverbnaya, I., Schäfer, M., and Budzikiewicz, H. (2008). Siderotyping of fluorescent *Pseudomonas*: molecular mass determination by mass spectrometry as a powerful pyoverdine siderotyping method. *Biometals*. 21, 259–271. doi:10.1007/s10534-007-9115-6.
- Mirleau, P., Philippot, L., Corberand, T., and Lemanceau, P. (2001). Involvement of nitrate reductase and pyoverdine in competitiveness of *Pseudomonas fluorescens* strain C7R12 in soil. *Appl. Environ. Microbiol.* 67, 2627–2635. doi:10.1128/AEM.67.6.2627-2635.2001.
- Rehman, H. M., Cooper, J. W., Lam, H.-M., and Yang, S. H. (2019). Legume biofortification is an underexploited strategy for combatting hidden hunger: Biofortification of legumes. *Plant Cell Environ.* 42, 52–70. doi:10.1111/pce.13368.
- Robin, A., Mazurier, S., Mougél, C., Vansuyt, G., Corberand, T., Meyer, J.-M., et al. (2007). Diversity of root-associated fluorescent pseudomonads as affected by ferritin overexpression in tobacco: Diversity of fluorescent pseudomonads in rhizosphere. *Environ. Microbiol.* 9, 1724–1737. doi:10.1111/j.1462-2920.2007.01290.x.
- Robin, A., Mougél, C., Siblot, S., Vansuyt, G., Mazurier, S., and Lemanceau, P. (2006). Effect of ferritin overexpression in tobacco on the structure of bacterial and pseudomonad communities associated with the roots: Structure of rhizosphere bacterial and pseudomonad communities. *FEMS Microbiol. Ecol.* 58, 492–502. doi:10.1111/j.1574-6941.2006.00174.x.
- Rus, A., Baxter, I., Muthukumar, B., Gustin, J., Lahner, B., Yakubova, E., et al. (2006). Natural variants of AtHKT1 enhance Na⁺ accumulation in two wild populations of *Arabidopsis*. *PLoS Genet.* 2, 10. doi:doi.org/10.1371/journal.pgen.0020210.

- Santos, C. S., Roriz, M., Carvalho, S. M. P., and Vasconcelos, M. W. (2015). Iron partitioning at an early growth stage impacts iron deficiency responses in soybean plants (*Glycine max* L.). *Front. Plant Sci.* 6. doi:10.3389/fpls.2015.00325.
- Schmidt, H., Günther, C., Weber, M., Spörlein, C., Loscher, S., Böttcher, C., et al. (2014). Metabolome analysis of *Arabidopsis thaliana* roots identifies a key metabolic pathway for iron acquisition. *PLoS ONE*. 9, e102444. doi:10.1371/journal.pone.0102444.
- Shirley, M., Avoscan, L., Bernaud, E., Vansuyt, G., and Lemanceau, P. (2011). Comparison of iron acquisition from Fe-pyoverdine by strategy I and strategy II plants. *Botany*. 89, 731–735. doi:10.1139/b11-054.
- Trapet, P., Avoscan, L., Klinguer, A., Pateyron, S., Citerne, S., Chervin, C., et al. (2016). The *Pseudomonas fluorescens* siderophore pyoverdine weakens *Arabidopsis thaliana* defense in favor of growth in iron-deficient conditions. *Plant Physiol.* 171, 675–693. doi:10.1104/pp.15.01537.
- van Loon, L. C., Bakker, P. A., van der Heijdt, W. H., Wendehenne, D., and Pugin, A. (2008). Early responses of tobacco suspension cells to rhizobacterial elicitors of induced systemic resistance. *Mol. Plant Microbe Interact.* 21, 1609–1621. doi:doi.org/10.1094/MPMI-21-12-1609.
- Vansuyt, G., Robin, A., Briat, J.-F., Curie, C., and Lemanceau, P. (2007). Iron acquisition from Fe-pyoverdine by *Arabidopsis thaliana*. *Mol. Plant Microbe Interact.* 20, 441–447. doi:doi.org/10.1094/MPMI-20-4-0441.
- Viollet, A., Pivato, B., Mougel, C., Cleyet-Marel, J.-C., Gubry-Rangin, C., Lemanceau, P., et al. (2017). *Pseudomonas fluorescens* C7R12 type III secretion system impacts mycorrhization of *Medicago truncatula* and associated microbial communities. *Mycorrhiza*. 27, 23–33. doi:10.1007/s00572-016-0730-3.
- Wezel, A., Casagrande, M., Celette, F., Vian, J.-F., Ferrer, A., and Peigné, J. (2014). Agroecological practices for sustainable agriculture. A review. *Agron. Sustain. Dev.* 34, 1–20. doi:10.1007/s13593-013-0180-7.
- White, P., and Broadley, M. (2005). Biofortifying crops with essential mineral elements. *Trends Plant Sci.* 10, 586–593. doi:10.1016/j.tplants.2005.10.001.
- Xiong, H., Kakei, Y., Kobayashi, T., Guo, X., Nakazono, M., Takahashi, H., et al. (2013). Molecular evidence for phytosiderophore-induced improvement of iron nutrition of peanut intercropped with maize in calcareous soil. *Plant Cell Environ.* 36, 1888–1902. doi:10.1111/pce.12097.
- Yakop, U. M. (2012). Physiological and genetic investigations of iron deficiency in field peas (*Pisum sativum* L.). *Ph. D. Thesis, University of Adelaide, Australia.*
<https://digital.library.adelaide.edu.au/dspace/handle/2440/78660>
- Zander, P., Amjath-Babu, T. S., Preissel, S., Reckling, M., Bues, A., Schläfke, N., et al. (2016). Grain legume decline and potential recovery in European agriculture: a review. *Agron. Sustain. Dev.* 36, 26. doi:10.1007/s13593-016-0365-y.
- Zribi, K., and Gharsalli, M. (2002). Effect of bicarbonate on growth and iron nutrition of pea. *J. Plant Nutr.* 25, 2143–2149. doi:10.1081/PLN-120014066.

Bilan

L'expérience d'inoculation des plantes avec la souche modèle *P. fluorescens* C7R12 ou avec son mutant non producteur de pyoverdine a montré que la présence de microorganismes influençait le statut en fer et le ionome des plantes. Néanmoins, les conditions expérimentales utilisées, et en particulier la présence de fer, bien que faible, n'ont pas permis l'observation d'effets attribuables à la synthèse de la pyoverdine par la souche sauvage. On peut de plus remarquer que le dispositif expérimental, dans lequel la croissance des plantes est de courte durée, est peu adapté à l'observation d'un effet bénéfique d'une inoculation sur la biomasse. En effet, un travail réalisé sur *Medicago truncatula* a montré qu'un effet positif sur la biomasse de la plante d'une inoculation de *P. fluorescens* C7R12 n'avait été significativement observable qu'après 63 jours de croissance (Viollet *et al.*, 2017).

Les résultats obtenus avec les ferripyoverdines ont montré, pour la première fois à notre connaissance, que des pyoverdines différentes pouvaient avoir des effets différents sur le statut en fer et le ionome des plantes. Ils ont également montré que ces effets variaient selon le génotype de la plante mettant en évidence des interactions spécifiques entre les pyoverdines et les plantes. En outre, comme précédemment décrit pour d'autres espèces végétales (*Arabidopsis*, graminées pérennes, trèfle incarnat), il a été montré que le pois peut assimiler le fer apporté sous forme d'un ferrisidérophore de *Pseudomonas* d'une façon plus efficace que le fer apporté sous forme de Fe-EDTA (Jin *et al.*, 2010; Shirley *et al.*, 2011; Vansuyt *et al.*, 2007). Toutefois cette observation n'a été faite que pour l'une des combinaisons « génotype de pois X Fe-pvd » étudiée : le pois T, tolérant à la chlorose ferrique en présence de Fe-pvd1T, la Fe-pvd préparée avec la pyoverdine produite par les bactéries majoritaires de son propre microbiote rhizosphérique. Il a de même été montré que les effets les plus favorables au pois S, sensible à la chlorose, ont été obtenus avec la pyoverdine des bactéries majoritaires de son propre microbiote, pvd2S. Ces résultats suggèrent donc que chaque plante a majoritairement recruté dans sa rhizosphère les *Pseudomonas* les plus favorables à sa nutrition en fer. Mais il a aussi été observé que, globalement, les ferripyoverdines ont été plus favorables à la nutrition en fer du pois T qu'à celle du pois S. Ces résultats ont soulevé l'hypothèse d'une implication de l'aptitude des plantes à utiliser les sidérophores bactériens dans la tolérance à la chlorose ferrique. Il était donc intéressant (i) d'étudier d'autres cultivars

de pois pour tester cette hypothèse et (ii) de chercher à mieux comprendre comment les plantes utilisent les sidérophores bactériens.

L'étude d'autres cultivars de pois a été entreprise dans mon équipe d'accueil dans le cadre du projet POSiTIF qui doit se poursuivre jusqu'à fin 2020 et qui a contribué à financer mon projet de thèse. Dans la thèse, on a cherché à mieux comprendre comment les plantes utilisent les sidérophores bactériens en étudiant, au niveau cellulaire, l'interaction entre une ferripyoverdine modèle (Fe-pvdC7R12) et une plante modèle (*A. thaliana*). Ce travail est présenté dans le chapitre suivant. L'interaction entre plante et ferripyoverdines a également été analysée au niveau moléculaire par l'étude de l'effet de Fe-pvds sur la transcription de gènes chez le pois. Ce travail fait l'objet du dernier chapitre.

Chapitre IV : Etude du statut en fer et de la morphologie des cellules racinaires d'*Arabidopsis thaliana* en présence d'un ferrisidérophore bactérien

Manuscrit soumis à "Journal of Experimental Botany"

Refusé avec encouragement à le soumettre à nouveau après avoir refait des expérimentations comportant plusieurs répliquats en spectroscopie d'absorption des rayons X

Les temps d'attente pour avoir accès à une ligne de lumière au synchrotron SOLEIL étant très longs, cette modification n'a pas pu être réalisée dans les temps pour être intégrée. En revanche, toutes les autres modifications demandées par les reviewers ont été prises en compte dans la version révisée du manuscrit présenté ici.

Avant-propos

Ce travail a été principalement réalisé par Laure Avoscan (Ingénieure d'étude dans mon équipe d'accueil). Mon implication dans le projet a concerné la réalisation des expérimentations en spectrométrie d'absorption des rayons X. L'analyse des échantillons d'*Arabidopsis* a été réalisée au cours de deux séjours d'une semaine au synchrotron SOLEIL à Paris-Saclay en 2017 et 2018 effectués avec Laure Avoscan et Jean-Paul Lemaitre (Maître de conférences dans mon équipe d'accueil). Au cours de ces séjours, des échantillons de pois ont également été analysés. L'impact de 2 ferripyoverdines (Fe-pvdC7R12 et Fe-pvd1T) sur les cultivars de pois S, sensible, et T, tolérant à la chlorose ferrique, a été étudié. Les temps de mise au point et d'acquisition des données étant extrêmement longs (environ 2 heures par échantillon), les échantillons traités avec la ferripyoverdine pvd2S n'ont pas pu être analysés. Les données correspondantes sont toujours en cours de traitement et n'ont pas pu être présentées. Des informations concernant la spectrophotométrie à absorption à rayons-X sont présentées en annexe (**Voir annexe 1**).

Des travaux antérieurs ont montré que la pvd produite par la souche modèle *P. fluorescens* C7R12 améliore la nutrition en fer d'*A. thaliana* ou encore de graminées pérennes (Vansuyt et al., 2007; Shirley et al., 2011). L'hypothèse d'une dissociation du complexe ou d'un échange de ligands, entre $[\text{Fe}^{3+} - \text{pvd}]$ et des sidérophores de la plante expliquant l'acquisition du fer à partir de Fe-pvd semble peu réaliste. En effet, la constante de stabilité d'un complexe $[\text{Fe}^{3+} - \text{pvd}]$ est bien plus élevée (10^{32}) que celle du complexe $[\text{Fe}^{3+} - \text{EDTA}]$ (10^{25}) et que celle d'un complexe $[\text{Fe}^{3+} - \text{phytosidérophore}]$, même formé avec un phytosidérophore puissant de type acide muginéique (10^{18}) (Vansuyt et al., 2007 ; Shirley et al., 2011). La pvd de C7R12 a été détectée dans des racines d'*Arabidopsis* par suivi de marquage à l'azote N^{15} et par immunodétection en utilisant des anticorps spécifiques (Trapet et al., 2016; Vansuyt et al., 2007). De plus il a été montré qu'un mutant d'*Arabidopsis*, dont le transporteur membranaire de Fe^{2+} du système d'acquisition du fer de stratégie I (IRT1) était inactivé, était toujours capable d'acquérir le fer à partir de $[\text{Fe}^{3+} - \text{pvd}]$ (Vansuyt et al., 2007). Ces résultats soutiennent l'hypothèse de l'existence d'un système non réductif d'acquisition du fer basé sur l'incorporation du complexe $[\text{Fe}^{3+} - \text{pvd}]$. L'objectif de l'étude présentée était de progresser dans la connaissance des mécanismes d'incorporation du fer par *Arabidopsis* à partir du complexe $[\text{Fe}^{3+} - \text{pvd}]$. Pour cela, différentes méthodes ont été associées : des méthodes de microscopie permettant l'analyse de la morphologie cellulaire et la détection de marquages de différents types (immunomarquage, marquage ^{15}N), et la spectroscopie d'absorption des rayons X permettant d'étudier les différentes formes de fer *in planta*.

Iron status and root cell morphology of *Arabidopsis thaliana* as modified by bacterial ferri-siderophore

Laure Avoscan¹, Tristan Lurthy¹, Jean-Paul Lemaître¹, Jeannine Lherminier², Christine Arnould², Camille Rivard^{3,4}, Ting-Di Wu⁵, Jean-Luc Guerquin-Kern⁵, Philippe Lemanceau¹ and Sylvie Mazurier^{1*}

¹ Agroécologie, AgroSup Dijon, INRA, Univ. Bourgogne, Univ. Bourgogne Franche-Comté, F-21000 Dijon, France

² Agroécologie, Plateforme DimaCell, AgroSup Dijon, CNRS, INRA, Univ. Bourgogne, Univ. Bourgogne Franche-Comté, F-21000 Dijon, France

³ Synchrotron SOLEIL, L'Orme des Merisiers, Saint Aubin, F-91192 Gif-sur-Yvette, France

⁴ INRA, UAR 1008 CEPIA, F-44000 Nantes, France

⁵ Institut Curie, INSERM U1196, Université Paris Sud, Université Paris Saclay, F-91405 Orsay, France

Running title: Fe(III)-pvd impacts plant iron status and root cell morphology

E-mail address: laure.avoscan@inra.fr; tristan.lurthy@inra.fr; jplemait@u-bourgogne.fr; jeannine.lherminier@inra.fr; christine.arnould@dijon.inra.fr; camille.rivard@synchrotron-soleil.fr; ting-di.wu@curie.fr; Jean-Luc.Guerquin-Kern@curie.fr; philippe.lemanceau@inra.fr; sylvie.mazurier@inra.fr

Total number of tables: 2

Total number of figures: 4

Total word count: 5061

Total number of supplementary data: 5 documents

words (6-10): *Arabidopsis thaliana*; Iron uptake; *Pseudomonas fluorescens*; Pyoverdine; Siderophore; Vesicles. Iron homeostasis; Iron nutrition; Iron stress;

*to whom correspondence should be addressed. E-mail : sylvie.mazurier@inra.fr

Phone: +33 3 80 69 30 93

1. Abstract

Evidence for the contribution of pyoverdine to iron nutrition of *Arabidopsis* has already been published. Here, we further analyzed the mechanisms and physiology of adaptations underlying plant iron nutrition by Fe(III)-pyoverdine (Fe(III)-pvd). An integrated approach combining X-ray absorption spectroscopy on bulk plant samples and microscopy observations was adopted to localize Fe(III)-pvd *in planta* and to assess the impact of this chelate on plant iron status and root cellular morphology. The results showed that Fe(III)-pvd was taken up as an integral complex by epidermal root cells via a non-reductive process, associated with an increased presence of vesicles. The Fe(III)-pvd was transported via the symplastic and/or trans-cellular pathway to the central cylinder and translocated from root to shoot. The bacterial iron chelate was further shown to remain present *in planta* several days after supplementation. All these processes led, as previously demonstrated, to an enhancement of plant iron nutrition. Overall, these findings suggest that bacterial ferri-siderophores contribute to plant iron uptake and homeostasis.

2. Introduction

Iron is an essential microelement for almost all living organisms. A significant proportion of their energetic metabolism is used for the acquisition of Fe from the environment and its safe utilization inside the cell. Due to its redox properties, iron is a central cofactor for enzymatic reactions that involve electron transfer in essential metabolic pathways such as respiration or photosynthesis (Balk and Schaedler, 2014). However, being a redox-active element, iron is also potentially toxic. Free Fe(II) catalyzes the Fenton reaction and generates reactive oxygen species (ROS) which may cause irreparable damage to cellular components when present in excessive concentrations (Winterbourn, 1995). The intracellular concentrations and forms of iron have therefore to be tightly regulated at the cellular level.

In soils, iron is largely present but mostly in forms non-available to plants and microorganisms, which have therefore developed active strategies of iron uptake (Lemanceau *et al.*, 2009; Robin *et al.*, 2008). Two active strategies of root iron uptake have been described for plants (Römheld and Marschner, 1986). Strategy I, used by dicots and non-Graminaceous monocots, relies on acidification of the rhizosphere increasing Fe(III) solubility, and on subsequent Fe(III) reduction to the more soluble Fe(II) prior to cell root uptake through a membrane transporter. Strategy II, used by Graminaceae, is a chelation-based mechanism mediated by externalized phytosiderophores (PS) that chelate Fe(III), and permit internalization of the corresponding complexes by root cells. Major progress has been achieved in knowledge of the regulation mechanisms and key molecular components that mediate these strategies of uptake and internal transport (Curie and Briat, 2003; Kobayashi and Nishizawa, 2012; Álvarez-Fernández *et al.*, 2014).

Nevertheless, it has long been recognized that this binary paradigm is probably an oversimplification. More than twenty years ago, Marschner and Römheld (1994) had already reviewed various studies that questioned the exclusive use of only one of the two strategies (I or II) for iron uptake by plants and referred to the possible contribution to iron acquisition of (i) low-molecular-weight root exudates such as phenolics which exhibit enhanced secretion under iron-deficient conditions and (ii) microbial siderophores. This early proposition (Marschner and Römheld 1994) has since been corroborated by several other studies. Ishimaru *et al.* (2006) demonstrated that rice, like strategy I plants, may incorporate Fe(II) in

addition to its regular Fe-PS (strategy II). Conversely, Xiong *et al.* (2013) reported that Fe-PS from a strategy II plant (maize) could be internalized by a strategy I plant (peanut) via a membrane transporter belonging to the YSL family of YS1 transporters of Fe-PS identified in maize (Curie *et al.*, 2001; Curie *et al.*, 2009). These examples indicate that some plants may combine both strategies of iron uptake.

It has also been shown that the enhanced secretion of phenolic compounds under iron-deficient conditions may contribute to iron uptake in strategy I plants via a chelation-based mechanism, as described in strategy II with phytosiderophores (e.g., Jin *et al.*, 2007; Fourcroy *et al.*, 2014; Lefèvre *et al.*, 2018). This is the case for *Arabidopsis thaliana* which secretes coumarin-derived compounds under iron stress conditions (Fourcroy *et al.*, 2014; Tsai *et al.*, 2018) which have been shown to chelate Fe(III) (Schmid *et al.*, 2014; Tsai *et al.*, 2018). This Fe(III)-chelating step may further be coupled with the strategy I reduction mechanism for ultimate iron acquisition by root cells (Fourcroy *et al.*, 2016). In addition, Jin *et al.* (2007) demonstrated that phenolic compounds released by red clover roots were involved in the reutilization of apoplastic iron (e.g. iron adsorbed on cell walls) which could represent a possible Fe source under iron stress conditions (Bienfait *et al.*, 1985; Lei *et al.*, 2014).

Finally, microbial siderophores (MS) chelated to iron were shown to contribute to plant iron nutrition of both dicots (Strategy I) and graminaceous monocots (Strategy II) more efficiently than synthetic ferric chelate (Fe(III)-EDTA) (Jin *et al.*, 2010; Shirley *et al.*, 2011; Vansuyt *et al.*, 2007). The stability constant of the complex Fe(III) and the MS pyoverdine, (10^{32}) (Vansuyt *et al.*, 2007 ; Shirley *et al.*, 2011), was significantly higher than that of Fe(III)-EDTA (10^{25}) or Fe-PS (10^{18}). This suggested that dissociation or ligand exchange between Fe(III)-pyoverdine (Fe(III)-pvd) and Fe-PS could be excluded to explain the enhanced iron nutrition by Fe-MS and thus the possible incorporation of Fe(III)-pvd by roots. This was confirmed by measurements of ^{15}N -labeled Fe(III)-pvd *in planta* and by immunodetection using anti-pyoverdine antibodies (Vansuyt *et al.*, 2007). These authors further demonstrated that the membrane transporter of Fe(II) in strategy I plants (IRT1) was not involved in iron uptake from Fe(III)-pvd. Taken together, the methods used so far have demonstrated i) that iron from Fe(III)-pvd can be used by the plant and ii) the incorporation of pyoverdine, but have not provided evidence for uptake of the entire Fe(III)-pvd complex. Similarly, incorporation of

the pyoverdine by the plant raised questions about transport and/or utilization of this molecule *in planta*.

To investigate these questions, we therefore applied an integrated approach associating X-ray absorption spectroscopy and microscopy to monitor the integral Fe(III)-pvd complex, to localize Fe(III)-pvd *in planta* and to assess the impact of this chelate on plant iron status and root cellular morphology. The results obtained open up new prospects in our understanding of the role of microbial siderophores in plant iron uptake and homeostasis.

3. Materials and methods

3.1. Production and purification of pyoverdine

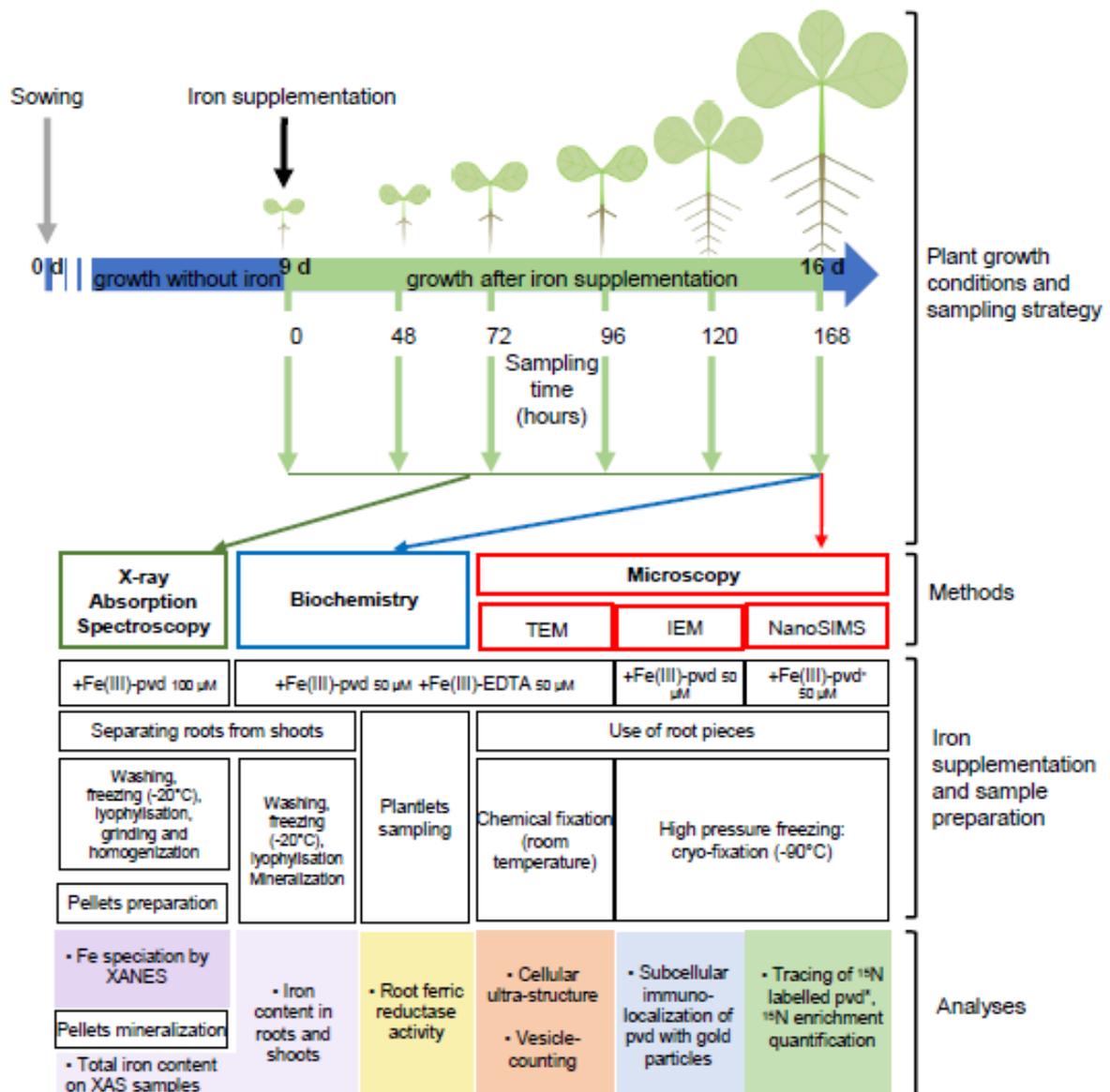
Pseudomonas fluorescens C7R12, an efficient biocontrol agent against pathogenic *Fusarium oxysporum*, was isolated from a soil naturally suppressive to soil-borne disease (Lemanceau and Alabouvette, 1991; Eparvier *et al.*, 1991). *P. fluorescens* C7R12 was grown in succinate medium (Meyer and Abdallah, 1978) at 25°C with shaking at 180 rpm for 72 h. Pyoverdine was obtained from the supernatant of bacterial cultures and purified as described by Hartney *et al.* (2013). Pyoverdine (pvd) labelled with ¹⁵N isotope was obtained using 99 % (NH₄)₂SO₄ ¹⁵N. Pyoverdine or ¹⁵N-labelled pyoverdine (pvd*) were mixed with a solution of inorganic FeCl₃ at a molar ratio of 1:1. Fe(III)-pvd, Fe(III)-pvd* and Fe(III)-EDTA stock solutions were filter-sterilized, adjusted to pH 4.5 and stored at 4°C in the dark.

3.2. Plant material, growth conditions and sampling

Seeds of *Arabidopsis thaliana* ecotype Columbia (Col-0) were sterilized for five min with a mixture of sodium hypochlorite (1.2%, v/v) and ethanol (50%, v/v), washed three times with sterile ethanol/water (96%, v/v), and dried in a flow chamber.

Sterilized seeds were sown under sterile conditions; 25 seeds per vertical 12 by 12-cm square petri dish on a gel made with Hoagland nutrient solution (pH 6.3) and 10 g l⁻¹ of Sigma A1296 agar (Sigma-Aldrich, St. Quentin Fallavier, France). The nutrient solution contained 5 mM NO₃ and Ca(NO₃)₂, 2 mM MgSO₄, 50 μM H₃BO₃, 5 μM MnSO₄, 15 μM ZnSO₄ 7 H₂O, 3 μM Na₂MoO₄ 2 H₂O, 2.5 μM KI(H₂O)₇ and CuSO₄ 5 H₂O. Concentration of residual Fe

Supplementary material S1. Schematic representation of experimental design and analytical setup. The upper part of the scheme summarizes plant growth conditions and sampling strategy. *Arabidopsis* seeds were grown without Fe supplementation for 9 days. After 9 d, iron was applied as 1 ml spread onto roots of plants grown on agar plates containing Hoagland nutrient agar. Samples were collected at 6 different times from 0 to 168 hours after iron supplementation for XAS analyses and after 168 hours for biochemical and microscopic analyses. Time of iron supplementation corresponded to sampling-time 0. The lower part of the scheme describes (i) the type of method used (specified in colored frames), (ii) iron supplementation and preparation of samples (summarized in black frames), and (iii) analyses performed (specified in colored rectangles in the vertical prolongation of the description of the preparation of corresponding samples).



evaluated in triplicate by HR ICP-MS was $8.68 \mu\text{M} \pm 0.58$. Plates were kept for 2 days at 4°C in the dark and then placed for 14 days in a growth chamber under controlled conditions of temperature (21°C), light (16/8h light/dark cycle of $300 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$), and relative humidity (70%).

Plantlet roots were supplemented with one ml of iron solutions differing according to the analyses performed:

- For analyses of the impact of iron source on plant iron content, three replicates of 50 plantlets were treated with Fe(III)-pvd or Fe(III)-EDTA ($50 \mu\text{M}$);
- For analyses of ferric reductase activity, four replicates of five plantlets were treated with Fe(III)-pvd or Fe(III)-EDTA ($50 \mu\text{M}$);
- For Transmission Electron Microscopy (TEM) analyses, three replicates of 25 plantlets were treated with Fe(III)-pvd or Fe(III)-EDTA ($50 \mu\text{M}$);
- For nanoscale secondary ion mass spectrometry (NanoSIMS) analyses, three replicates of 50 plantlets were treated with Fe(III)-pvd* ($50 \mu\text{M}$);
- For immunoelectron microscopy (IEM) analyses, three replicates of 50 plantlets were treated with Fe(III)-pvd or Fe(III)-EDTA ($50 \mu\text{M}$);
- For X-ray absorption spectroscopy (XAS) analyses, 200 plantlets were treated with Fe(III)-pvd ($100 \mu\text{M}$) per sampling time.

After iron supplementations, plantlets were cultivated in a growth chamber for seven additional days. Details of the experimental design and schematic analytical setup are presented in supplementary material (**Supplementary material S1 at JXB online**).

3.3. Iron content in roots and shoots

Total iron content was determined by spectrophotometry at 535 nm, using bathophenanthroline as Fe(II) chelator, after mineralization of samples as detailed in Trapet *et al.* (2016). Measurements were performed in triplicate.

3.4. Root ferric reductase activity

Plantlets were incubated under agitation (70 rpm) in the dark at room temperature for 30 min in 2-ml of a solution containing 0.1 mM Fe(III)-EDTA and 0.3 mM Ferrozine (Sigma-Aldrich, St. Quentin Fallavier, France). Ferric reductase activity was quantified by measuring spectrophotometrically the formation of purple-colored Fe(II)-ferrozine complex at 562 nm (Beckman-Coulter DU800, Massachusetts, USA) using a molar extinction coefficient of 28.6 mM⁻¹cm⁻¹ (Gibbs, 1976) with 1ml of the same assay solution used as a blank.

3.5. Transmission Electron Microscopy

Chemical fixation was performed on two-millimetre-long pieces of roots sampled from 16-day-old *A. thaliana* grown for 168 h in the presence of either Fe(III)-pvd or Fe(III)-EDTA (50 µM). Samples were fixed with 2% glutaraldehyde and 3% paraformaldehyde in phosphate buffer (PBS) 0.1 M pH 7.2, followed by 1% osmium tetroxide in PBS for 1 h at 4°C. Samples were then dehydrated through graded baths of ethanol and propylene oxide, and finally embedded in Epon (Spi-Chem) according to the standard procedure for conventional TEM (Luft, 1961). Ultrathin sections (90 nm) were cut with a diamond knife blade on a Reichert Ultracut E ultramicrotome (Leica, Vienna, Austria). They were collected on grids, counterstained with 5% aqueous uranyl acetate (w/v) and 0.5% aqueous lead citrate (Reynolds, 1963) for conventional TEM, then examined with a transmission electron microscope (HITACHI H7500) operating at 80 kV and equipped with an AMT camera driven by AMT software (AMT, Woburn, USA).

Vesicles present between the plasma membranes (PM) and cell walls (CW) were counted on a cumulated length of 1200-µm of PM observed in 40 sections. Three classes were defined based on the number of vesicles per µm of PM (i.e. low: 1-2, medium: 3-6, high: >7).

Supplementary material S2: Freeze-substitution and embedding protocols modified from Studer *et al.* (2001) were used for nanoSIMS analysis using a Leica automatic freeze substitution unit (AFS, Vienna, Austria). Infiltration was performed for 5 days at room temperature with Spurr resin (ultra-low viscosity embedding media kit, Polysciences Europe, Eppelheim, Germany), which polymerized for 48 h at 70°C. Key steps are summarized in the table below:

Freeze substitution and embedding protocol		
Freeze Substitution	Substitution fluid	program of freeze unit
Steps	0.1% Uranyl acetate in anhydrous acetone	Start at -90°C for 96 h Ramped to -60°C over 6 h Held at -60°C for 16 h Ramped to -30°C over 6 h Held at -30°C for 24 h
	Substitution fluid was replaced three times with 100% acetone over 30 min	
	100% acetone	Held at -30°C for 9 h Ramping to 0°C over 6 h Held at 0°C for 12 h Ramped to 4°C over 48 min Held at 4°C for 48 h Ramped to 20°C over 3 h Held at 20°C for 72 h
Embedding	Infiltration fluid	Incubation at room temperature
Steps	10% Spurr resin + 90% acetone	2 h
	20% Spurr resin + 80% acetone	2 h
	30% Spurr resin + 70% acetone	3 h and overnight
	50% Spurr resin + 50% acetone	8 h
	60% Spurr resin + 40% acetone	Overnight
	80% Spurr resin + 20% acetone	8 h
	100% Spurr resin	8 h
	100% Spurr resin	Overnight
Polymerization	Carried out at 70°C	48 h

Studer D, Graber W, Al-Amoudi A, Eggli P. 2001. A new approach for cryofixation by high-pressure freezing. *Journal of Microscopy* 203, 285–294.

3.6. Samples preparation for nanoscale secondary ion mass spectrometry (NanoSIMS) analysis

Cryofixation was performed on two-millimetre-long pieces of 16-day-old *A. thaliana* roots grown for 168 h in the presence of Fe(III)-pvd* (50 μ M). Samples were placed in a 3-mm-diameter aluminium specimen carrier with a cavity of 200 μ m filled with hexadecene as cryoprotectant, and immediately frozen in a Leica High-Pressure Machine 100 (HPM 100, Leica, Vienna, Austria). Samples were stored in liquid nitrogen and freeze-substituted with Spurr[®] resin (ultra-low viscosity embedding media kit, Polysciences Europe, Eppenheim, Germany) using a Leica automatic freeze substitution unit (AFS, Leica, Vienna, Austria). Detailed procedures of freeze substitution and embedding are presented in **Supplementary material S2**.

NanoSIMS analyses were carried out on ultrathin sections of 100–120 nm collected on a solid 7x7 mm silicium square. Imaging SIMS analyses were obtained with a Cameca NanoSIMS 50 ion microprobe (Cameca, Courbevoie, France). Dynamic SIMS imaging was performed using a NanoSIMS-50™ ion microprobe (Cameca, Courbevoie, France) operating in scanning mode. The primary ion beam was generated either from a caesium source (Cs⁺) or oxygen source (O⁻) for negative (for ¹²C¹⁴N⁻ and ³¹P⁻) or positive (for ⁴⁰Ca⁺ and ²³⁸U⁺) secondary ion analyses, respectively. Images were processed using the ImageJ software (<https://imagej.nih.gov/ij/>).

Supplementary material S3: Freeze-substitution protocol used for embedding samples for immunoelectron microscopy (IEM) was performed using a freeze substitution unit (Leica automatic AFS, Vienna, Austria). Infiltration was performed for 5 days with Lowicryl® HM20 resin (Lowicryl HM kit; Polyscience Europe, Eppelheim, Germany). Key steps of the protocol are summarized in the table below. Samples in resin were polymerized under UV light at -50°C, and then ramped up at room temperature. IEM was performed on HM20-embedded sections. Grids with sections were treated with blocking solution containing 0.1% (w/v) acetylated Bovine Serum Albumin (BSA), 0.5% (w/v) skim milk, 100 mM glycine and 10% (v/v) Normal Goat Serum in 10 mM Phosphate-Buffered Saline solution (PBS, 10 mM K₂HPO₄/KH₂PO₄, 150 mM NaCl, pH 7.4) for 30 min. After washing in 0.1% acetylated BSA in PBS three times for 5 min each, grids were incubated for 1 h at room temperature in a solution containing the primary antibody against pyoverdine diluted (1:800) in PBS buffer. They were then rinsed three times for 5 min in washing buffer (acetylated BSA in PBS) and incubated for 1 h with a secondary antibody, goat anti-rabbit IgG (1:25 dilution in PBS), labeled with 15-nm gold particles (EMGAR 15; British BioCell International). Grids were washed for 5 min five times in PBS buffer and three times in double-distilled H₂O. Quantification of gold labelling was carried out by counting 15 nm-gold particles on a total of 20 cells per type of tissue (epidermis, cortex or central cylinder) and, normalized to area using ImageJ software (NIH).

Freeze substitution and embedding protocol		
Freeze Substitution	Substitution fluid	AFS program machine
Steps	0.2% uranyl acetate in anhydrous acetone	Starting at -90°C for 96 h
		Ramped to -80°C over 2 h
		Held at -80°C for 24 h
		Ramped to -60°C over 4 h
	Freeze substitution fluid was replaced with three changes of 100% ethanol for 24 h	
	100% ethanol	Ramped to -50°C over 1 h
Embedding	Infiltration fluid	AFS program machine
Steps	30% HM20 resin + 70% acetone	Held at -50°C overnight
	50% HM20 resin + 50% acetone	Held at -50°C for 2 h
	70% HM20 resin + 30% acetone	Held at -50°C for 2 h
	100% HM20 resin	Held at -50°C for 2 h
	100% HM20 resin	Held at -50°C overnight
	100% HM20 resin	Held at -50°C for 2 h
Polymerization	UV light	
Steps	100% HM20 resin	Held at -50°C for 48 h Ramped to -35°C over 3 h Held at -35°C for 24 h Ramped to 0°C over 7 h

3.7. **Immunoelectron microscopy (IEM)**

Cryofixation was performed on roots of 16-day old plantlets cultivated for 168 h in the presence of either Fe(III)-pvd or Fe(III)-EDTA (50 μ M). Briefly, samples were immediately high pressure frozen with a Leica HPM 100 and freeze-substituted with Lowicryl[®] HM20 resin (Biovalley, Nanterre, France) in an AFS. Ultrathin sections (90 nm) were cut as above and collected on Formvar-carbon-coated 300-mesh nickel grids. A solution of pvd antibody (Vansuyt *et al.*, 2007) diluted at 1/800 and of an anti-rabbit conjugated with 15-nm colloidal gold diluted 1/25 (secondary antibody) were successively applied prior to TEM observations. These observations were carried out using a Hitachi electron microscope (HITACHI H7500, Japan) as described above. The detailed procedures for freeze substitution, embedding and IEM are presented in **Supplementary material S3**. The nanogold particles were counted on thirty-one 15 μ m²-sized IEM images and ascribed to epidermis, cortex or central cylinder depending on their location. The results were subjected to one-way ANOVA followed by pair-wise comparisons with Fisher's least significant test.

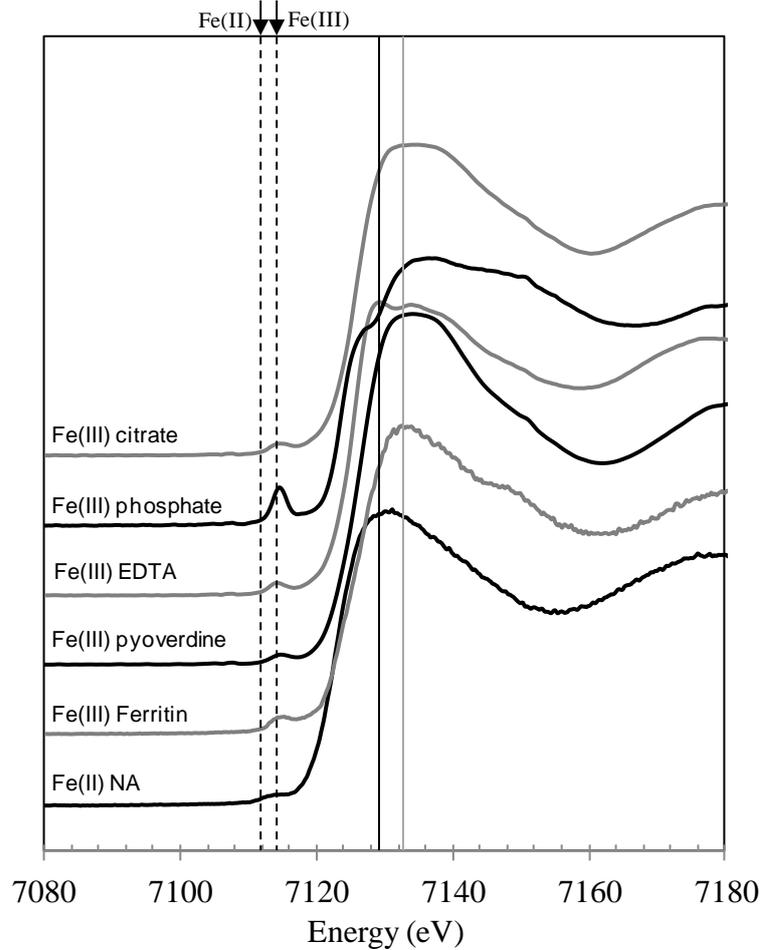
3.8. **X-ray absorption spectroscopy (XAS)**

Iron K-edge X-ray absorption near edge structure (XANES) was performed on samples prepared from plantlets grown for 0, 48, 72, 96, 120 and 168 hours in the presence of Fe(III)-pvd (100 μ M) (**Supplementary material S1**). Roots and shoots from 200 plantlets per sampling date were separately washed for 30 min under agitation in a buffer as previously described (Vansuyt *et al.*, 2007), freeze-dried, ground to a fine powder in an agate mortar, and finally pressed into 5 mm-diameter pellets (1-2 mm thickness).

XAS experiments were performed at the Synchrotron SOLEIL operating at 2.75 GeV (Gif sur-Yvette, France) on LUCIA beamline (Flank *et al.* 2006, Vantelon *et al.* 2016). The X-rays are produced by an undulator APPLE-type II and the high-order harmonics are minimized by a low pass-filter consisting of two Ni-coating Si mirrors. The X-ray beam was monochromatized with a Si(111) two-crystal monochromator, calibrated using the maximum intensity of the first derivative of FeO foil (7112 eV). The measurements were done under vacuum (10⁻⁷ mbar) and cryo conditions (N2 cryostat) with a non-focused beam (2 x 2 mm²).

Supplementary material S4. Normalized Fe K-edge XANES spectra obtained for the selected Fe reference compounds. Pre-edge structures of iron (II) and iron (III) are indicated by vertical dashed lines. The white line of the two oxidation states (Fe(II)) and (Fe(III)) was clearly different as indicated by the vertical black line (white line of Fe(II)-nicotianamine) and the vertical gray line (white line of Fe(III)-ferritin).

From bottom to top: Fe(II) NA-nicotianamine chelated to ferrous iron (Fe(II), in solution), Fe(III) Ferritin-ferritin chelated to ferric iron (Fe(III), in solution), Fe(III)-pyoverdine, pyoverdine chelated to Fe(III), Fe(III) EDTA-EDTA chelated to Fe(III), Fe(III) phosphate-phosphate chelated to Fe(III) and Fe(III) citrate-citrate chelated to Fe(III).



In order to optimize signal-to-noise ratio, XANES spectra of the plant samples and of the most diluted references (Fe(II)-nicotianamine, Fe(III)-pvd and Fe(III)-ferritin) were recorded in fluorescence mode using a 60 mm² Bruker Silicon Drift diode detector whereas XANES spectra of the more concentrated references (Fe(III)-EDTA, Fe(III)-phosphate, Fe(III)-citrate) were collected in transmission mode using a photo diode. XANES acquisitions were collected in FlyScan (continuous) mode on 7.05 - 7.3 keV energy range, with an energy step of 0.2 eV and a counting time of 50 ms/step.

The following Fe reference compounds (all in solid state unless noted) were used: nicotianamine chelated to ferrous iron Fe(II), solution in methanol (pH 7), ferritin chelated to ferric iron Fe(III), commercial solution (pH 5.5-5.7 as indicated by the supplier), pvd chelated to Fe(III), EDTA chelated to Fe(III), phosphate chelated to Fe(III), citrate chelated to Fe(III), and metallic Fe, Fe(0). Solid standards were diluted with pure microcrystalline cellulose (powder) to a concentration compatible with the detection range and pressed into 5 mm-diameter pellets. For commercial liquid standards, a drop was placed between two thin ultralene[®] films in a special sample holder designed for the LUCIA set up and instantly frozen with liquid nitrogen. Purity was >99% for all the reagents except nicotianamine (95%). All compounds were purchased from Sigma-Aldrich (Saint-Quentin Fallavier, France) except for nicotianamine (LGC standards, Molsheim, France). The reference spectra are presented in **supplementary material S4**. The position of the beam on the pellets was changed between each scan to limit radiation damage. Depending on the Fe concentration, 10 to 80 quick scan spectra were recorded and averaged to optimize the signal-to-noise ratio (average spectra). No radiation damage was observed during these successive data collections. XANES spectra were corrected for background absorption by subtracting a linear function before the edge and normalized using a linear or to-degree polynome and the program package ATHENA (Ravel and Newville, 2005).

A fingerprint approach was used to simulate the experimental spectra averaged from samples by linear combination of the reference iron compounds spectra using Athena software. The best match between the fitted model spectra and the experimental spectrum was estimated from the lowest reduced chi value (χ^2) and R-factor as determined using the program package ATHENA in Demeter 0.9.20 system (Newville 2001; Ravel and Newville, 2005). The iron valence was also estimated by examining the pre-edge structure (Wilke *et*

al., 2001). E_0 edge energy was chosen as the maximum of the data first derivative. Spectra were background corrected using a linear regression fit through the pre-edge region [E_0-22 eV; E_0-8 eV] and a polynomial regression fit through the post-edge region [E_0+28 (+/-3) eV; E_0+42 eV], aiming at a horizontal post-edge signal. The fractional contribution of each reference spectrum to the fit was then directly related to the proportion of iron species in the plant samples. A precision of ± 10 % on the relative proportion of the different contributions is expected from the method (Avoscan *et al.* 2009). Therefore, combinations that explained less than 10% of the fit were not considered which generally limited the number of components to 4. E_0 edge energy was chosen as the maximum of the data first derivative. Spectra were background corrected using a linear regression fit through the pre-edge region [E_0-22 eV; E_0-8 eV] and a polynomial regression fit through the post-edge region [E_0+28 (+/-3) eV; E_0+42 eV], aiming at a horizontal post-edge signal. Linear combination fittings were performed with Athena over the [E_0-10 eV, E_0+30 eV] range on normalized bulk XANES; relative proportions of the components, were forced to sum to 100 %. Linear combination fittings were done considering or not the presence of Fe(0), which is considered to be an artifact created by sample irradiation with high intensity synchrotron X-rays (Terzano *et al.*, 2013).

3.9. Statistical analyses

Pearson's chi-square test and one-way ANOVAs, followed by pair-wise comparisons with Fisher's least significant test, were performed using XLSTAT (XLSTAT 19.02, Addinsoft, Paris, France).

Table 1. Compared effect of Fe(III)-pvd and Fe(III)-EDTA supply on iron concentration ($\mu\text{g g}^{-1}$ DW) measured colorimetrically using bathophenanthroline in roots and shoots and whole plant of *A. thaliana*.

	Roots	Shoots	Whole plant
Fe(III)-pvd	98.7 \pm 13.8 _a	76.9 \pm 2.0 _a	80.8 \pm 3.9 _a
Fe(III)-EDTA	85.4 \pm 15.6 _{ab}	77.4 \pm 8.7 _a	80.9 \pm 4.7 _a
No-Fe-added	73.5 \pm 11.7 _b	64.1 \pm 8.7 _a	76.1 \pm 13.3 _a

Within a given column, means with the same letter are not significantly different ($p \leq 0.05$) based on one-way ANOVA followed by Fisher's least significant difference test.

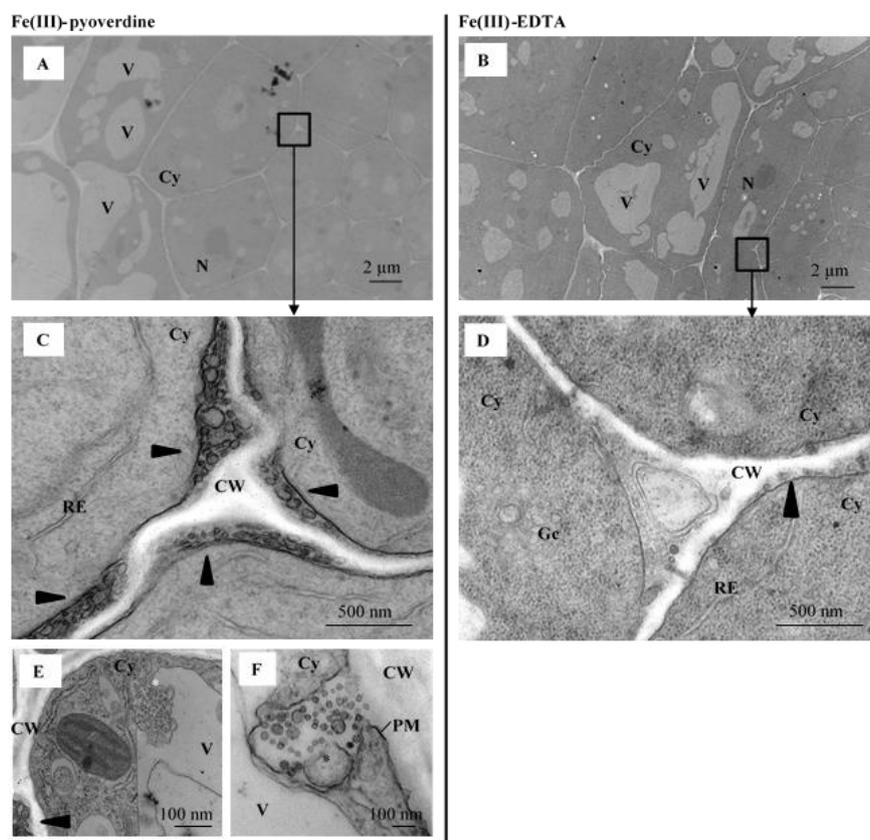


Figure 1. Representative transmission electron microscopy (TEM) images showing general morphology and ultrastructure of root cells of *A. thaliana* supplemented with Fe(III)-pvd (50 μM) or Fe(III)-EDTA (50 μM). (A, B) Transmission electron micrographs of cross-sectioned roots of *A. thaliana* showing the general morphology of root cells of *A. thaliana* supplemented with Fe(III)-pvd (A) or with Fe(III)-EDTA (B). (C, D) Areas delimited by the black rectangles on A and B presented at higher magnification showing vesicles (marked with arrowheads) localized between PM and CW in root cells of *A. thaliana* supplemented with Fe(III)-pvd (C) and Fe(III)-EDTA (D). (E, F) Details of root cells of *A. thaliana* supplemented with Fe(III)-pvd showing the presence of numerous vesicles in the cytoplasm close to the vacuole (E, white asterisk) and near the plasma membrane (F, black asterisk). Cy, cytoplasm; CW, cell wall; Gc, golgi complex; N, nucleus; PM, plasma membrane; RE, reticulum endoplasmic; V, vacuole.

4. Results

4.1. *Effect of Fe(III)-pvd and Fe(III)-EDTA on plant iron content and root ferric reductase activity*

The roots iron concentration of plants supplemented with Fe(III)-pvd was significantly higher than that of No-Fe-added control (**Table1**). No significant difference was observed in shoots and whole plant iron concentration between plants supplemented or not with iron (**Table 1**). Compared to the No-Fe-added control, the increased iron concentration in roots of plants supplemented with iron Fe(III)-pvd wasn't associated with a significant increase of root ferric reductase activity. Root ferric reductase activity of No-Fe-added control plants

4.2. *Effect of Fe(III)-pvd and Fe(III)-EDTA on root ultrastructure and presence of vesicles*

At low magnification (tissue level), the TEM images of root cell sections from plantlets supplemented with Fe(III)-pvd and Fe(III)-EDTA showed the usual shape with large central nuclei, many small vacuoles, a fine unbroken plasma membrane with adherence to the cell wall (**Fig. 1A and 1B**, respectively). The cell wall was uniform in thickness. Cells showed a classic pattern of cell division or elongation, with dense cytoplasm and numerous active organelles (mitochondria, Golgi complex, endoplasmic reticulum) regardless of the treatment. At higher magnification (cellular level), the TEM images from plants supplemented with Fe(III)-pvd showed numerous vesicles located in the cell wall, intercellular spaces (**Fig. 1C and 1E**), cytoplasm (**Fig. 1E**), and closely associated with the plasma membrane (**Fig. 1F**). Vesicles were also detected in plants supplemented with Fe(III)-EDTA (**Fig. 1D**) but at a significantly lower frequency as indicated by the comparison of vesicle counts on TEM images in the presence of Fe(III)-pvd and Fe(III)-EDTA (**Fig. 2**).

4.3. *Localization of pyoverdine and of Fe(III)-pvd in plants supplemented with the iron chelate*

Three types of methodologies were applied to monitor the fate of pvd and of Fe(III)-pvd *in planta*: (i) nanoscale secondary ion mass spectroscopy (NanoSIMS) and immunoelectron microscopy (IEM) to localize pvd from Fe(III)-pvd chelate within the root cells, and (ii) X-ray absorption spectroscopy near edge structure (XANES) to distinguish the entire Fe(III)-pvd chelate from other forms of iron in roots and shoots of *A. thaliana*.

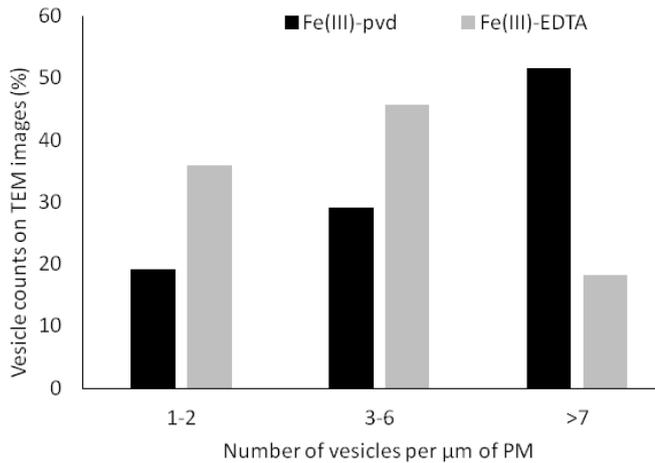


Figure 2. Histogram showing the frequency distribution of vesicle counts in root cells of *A. thaliana* supplemented with Fe(III)-pvd (50 μM) or Fe(III)-EDTA (50 μM). The frequency distribution of vesicle counts in three classes of occurrence (Low, from 1 to 2 vesicles per μm of PM; Medium, from 3 to 6 vesicles per μm of PM; High, 7 or more vesicles per μm of PM) differed significantly when *A. thaliana* was supplemented with Fe(III)-pvd or Fe(III)-EDTA, as compared by chi-square test ($\chi^2 = 41.57$, $p = 9.38 \cdot 10^{-10}$).

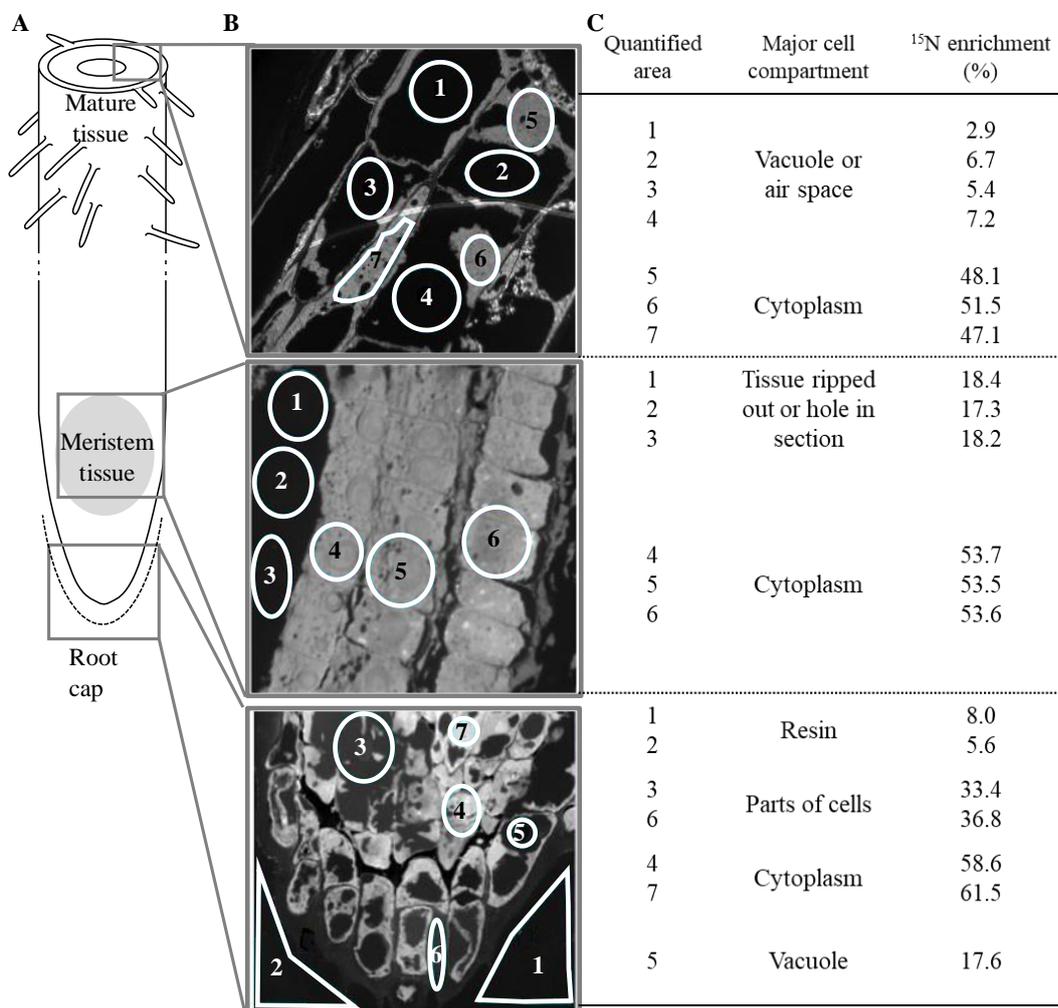


Figure 3. Tracing of ^{15}N from ^{15}N -labelled pvd by nanoscale secondary ion mass spectrometry (NanoSIMS) images in root tip of *A. thaliana* supplemented with Fe(III)-pvd* (50 μM). (A) Schematic representation of the root tip encompassing the three zones (grey rectangles) subjected to NanoSIMS analysis. (B) Localization of the areas in which ^{15}N enrichment was quantified (delimited by a white line). (C) ^{15}N -enrichment expressed as a percentage calculated from the isotopic ratio $^{15}\text{N}:^{14}\text{N}$ for each quantified area (presented in B) and information about the nature of the corresponding compartment.

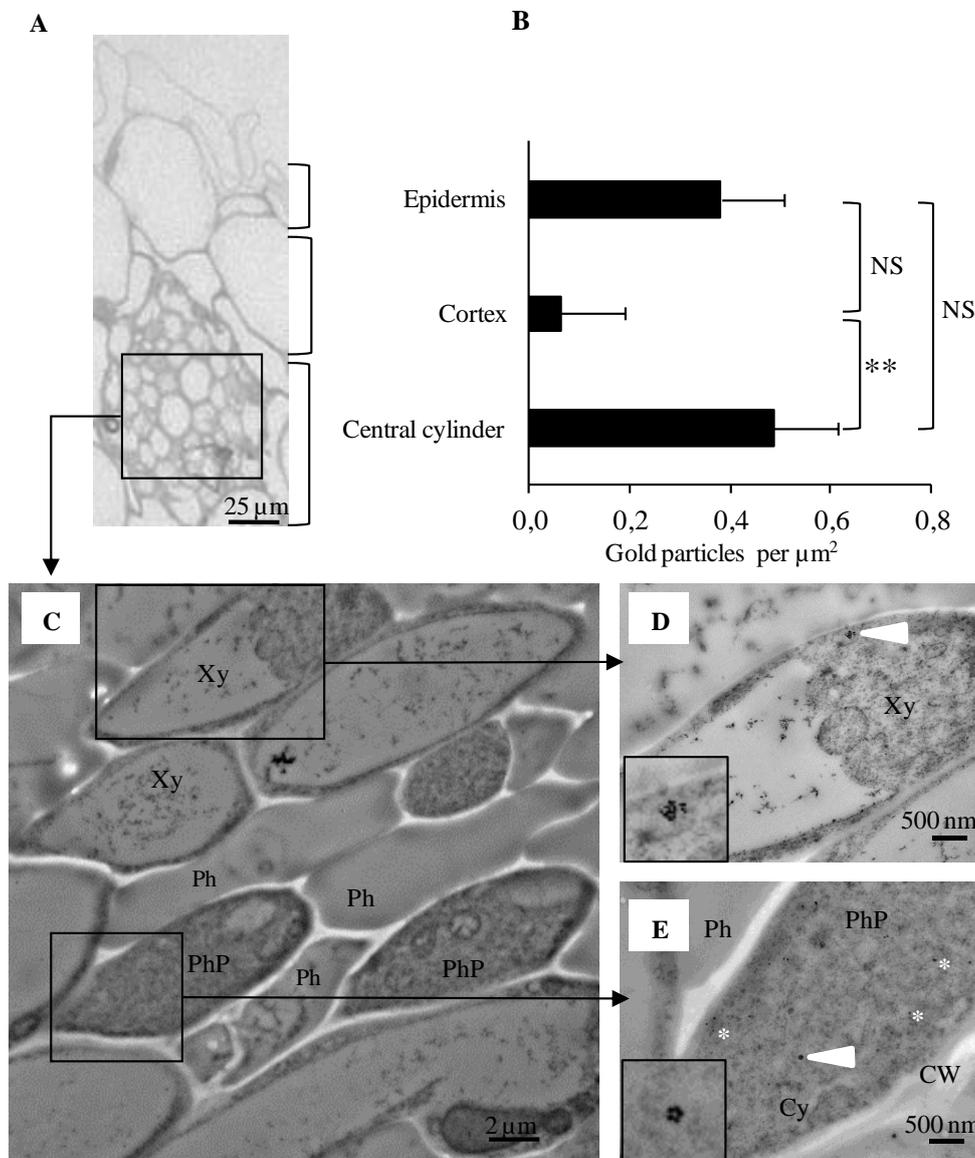
Tracing ^{15}N -labelled pvd by NanoSIMS analysis. ^{15}N from isotopically labelled pyoverdine (pvd*) was detected in all three root zones (mature tissue, meristem tissue and root cap) of 16-day-old plantlets supplemented with Fe(III)-pvd* (**Fig. 3A**). NanoSIMS mapping and the corresponding amounts of isotope in various areas within these three root zones are shown in **Fig. 3B and 3C**. The highest ^{15}N enrichments (>50%) in these three zones, were observed in areas composed predominantly of cytoplasm, as compared to the background $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$ ratio measured in the embedding resin on the sides of the preparations. No significant ^{15}N enrichment was recorded in vacuoles (**Fig. 3B, 3C**).

Tracing of pvd by immunoelectron microscopy (IEM). Immunogold labelling of pvd and analyses by TEM were carried out on the three root zones (mature tissue, meristem tissue and root cap) of 16-day-old plantlets supplemented with Fe(III)-pvd, as defined in **Figure 3A**. The results revealed the presence of pyoverdine in the mature tissue zone, more specifically in the conductive vessels and epidermis (**Fig. 4**), but not in the meristem tissue and root cap zones (data not shown).

The numbers of gold particles marking pvd per μm^2 of root area in the epidermis, cortex and central cylinder, were counted on IEM images (**Fig. 4B**). Gold particles were detected in all three root tissues. Density of gold particles was higher in the central cylinder and epidermal cells than in the cortex cells. The strongest labelling in the central cylinder was observed in the xylem and phloem tissues (**Fig. 4B, 4C, 4D, 4E**).

Tracing of Fe(III)-pvd and analysis of Fe speciation by Fe K-edge XANES spectroscopy. The iron species present in bulk plant samples were determined from the Fe K-edge spectra XANES of the reference compounds (Fe(II)-nicotianamine, Fe(III)-ferritin, Fe(III)-pvd, Fe(III)-EDTA, Fe(III)-phosphate, and Fe(III)-citrate). The spectra of the iron reference compounds were well differentiated and the edges of the two Fe oxidation states (Fe(II) and Fe(III)) could be clearly distinguished (**Supplementary material Fig. S4**). Fe K-edge spectra, obtained from plantlets samples supplemented with Fe(III)-pvd, could all be fitted using a linear combination of the iron reference compounds XANES spectra (an example is shown in **Supplementary material Fig. S5 see page 195-196**). The XANES spectra recorded on plantlet samples could be fitted with a linear combination of four of the six reference compounds: Fe(II)-nicotianamine, Fe(III)-ferritin, Fe(III)-phosphate and Fe(III)-pvd (Table 2). All corresponding XANES linear fits are presented in **Supplementary material Figure S5 see page 195-196**.

Figure 4. Results of immunoelectron microscopy localization of pyoverdine (pvd) in root cells of *A. thaliana* supplemented with Fe(III)-pvd (50 μ M) and representative immunoelectron microscopy (IEM) images showing immunogold particles marking pvd. (A) Toluidine-blue-stained cross-section of *A. thaliana* root presenting the root tissues in which gold particles were quantified: epidermis, cortex and central cylinder. (B) Histogram showing the amounts of immunogold particles in cells from these root tissues on IEM images. Error bars represent the standard deviation; significant differences were determined by one-way ANOVA followed by Fisher's least significant difference test (**, $p \leq 0.01$; NS, not significant $p > 0.05$). (C) Representative IEM image showing an increased presence of immunogold particles marking pvd in the central cylinder (root zone corresponding to the one delimited by a black rectangle in A). (D, E) Areas delimited by black rectangles on C presented at higher magnification. (D) Cluster of 15-nm colloidal gold particles marking pvd inside a vesicular structure in a xylem cell (marked with a white arrowhead and magnified in a black rectangle). (E) Five gold particles marking pvd in phloem parenchyma (marked with a white arrowhead and magnified in a black rectangle), white asterisks indicate other clusters of gold particles marking pvd. CW, cell wall; Cy, cytoplasm; Ph, phloem; PhP, phloem parenchym; Xy, xylem.



In roots, at the time of Fe(III)-pvd supplementation, Fe(III) and Fe(II) represented 78% and 22% of the oxidation states, respectively, and were assigned to two iron species, Fe(III)-ferritin and Fe(II)-nicotianamine (**Table 2**). After 48 h, the proportion of Fe(III) decreased (60%) while that of Fe(II) increased (40%); Fe(III)-pvd was detected in addition to Fe(III)-ferritin, (**Table 2**). From 72 h to 168 h, the iron oxidation state was mostly represented by Fe(III) (84%-100%). Fe(III)-pvd was present until the end, while Fe(II)-nicotianamine and Fe(III)-phosphate were detected transiently at 72 h and 96 h, respectively. Fe(III)-ferritin remained the most frequently detected form of iron in roots from beginning to end.

In shoots, at the time of Fe(III)-pvd supplementation, Fe(III) and Fe(II) represented 72% and 28%, respectively, and corresponded to Fe(III)-ferritin, Fe(III)-phosphate and Fe(II)-nicotianamine (**Table 2**). From 48 h to 120 h, the proportion of Fe(III) oscillated between 70% and 98% and Fe(III)-pvd was detected in addition to the three iron species initially present (**Table 2**). At 168 h, the iron oxidation state was mostly represented by Fe(III) (85%) which was chelated to ferritin and phosphate but no longer to Fe(III)-pvd, while Fe(II) (15%) remained as chelated to nicotianamine.

Table 2. Relative representation (%) of four iron species in shoots and roots of *A. thaliana* at six different times after supplementation of plants with Fe-pvd as determined by linear combination fitting (LCF) of Fe K-edge XANES spectra. A precision of ± 10 % on the relative proportion of the different contributions is expected from the method (Avoscan *et al.*, 2009).

Time after Fe-pvd supplementation (h)	Plant compartment	Fe species (%)			
		Fe(III)-ferritin	Fe(II)-NA	Fe(III)-P	Fe(III)-pvd
0	Shoots	65	28	8	0
	Roots	78	22	0	0
48	Shoots	40	34	7	18
	Roots	50	40	0	10
72	Shoots	46	21	19	14
	Roots	68	16	0	16
96	Shoots	47	23	17	14
	Roots	76	0	12	12
120	Shoots	34	30	17	18
	Roots	88	0	0	12
168	Shoots	74	15	11	0
	Roots	87	2	0	11

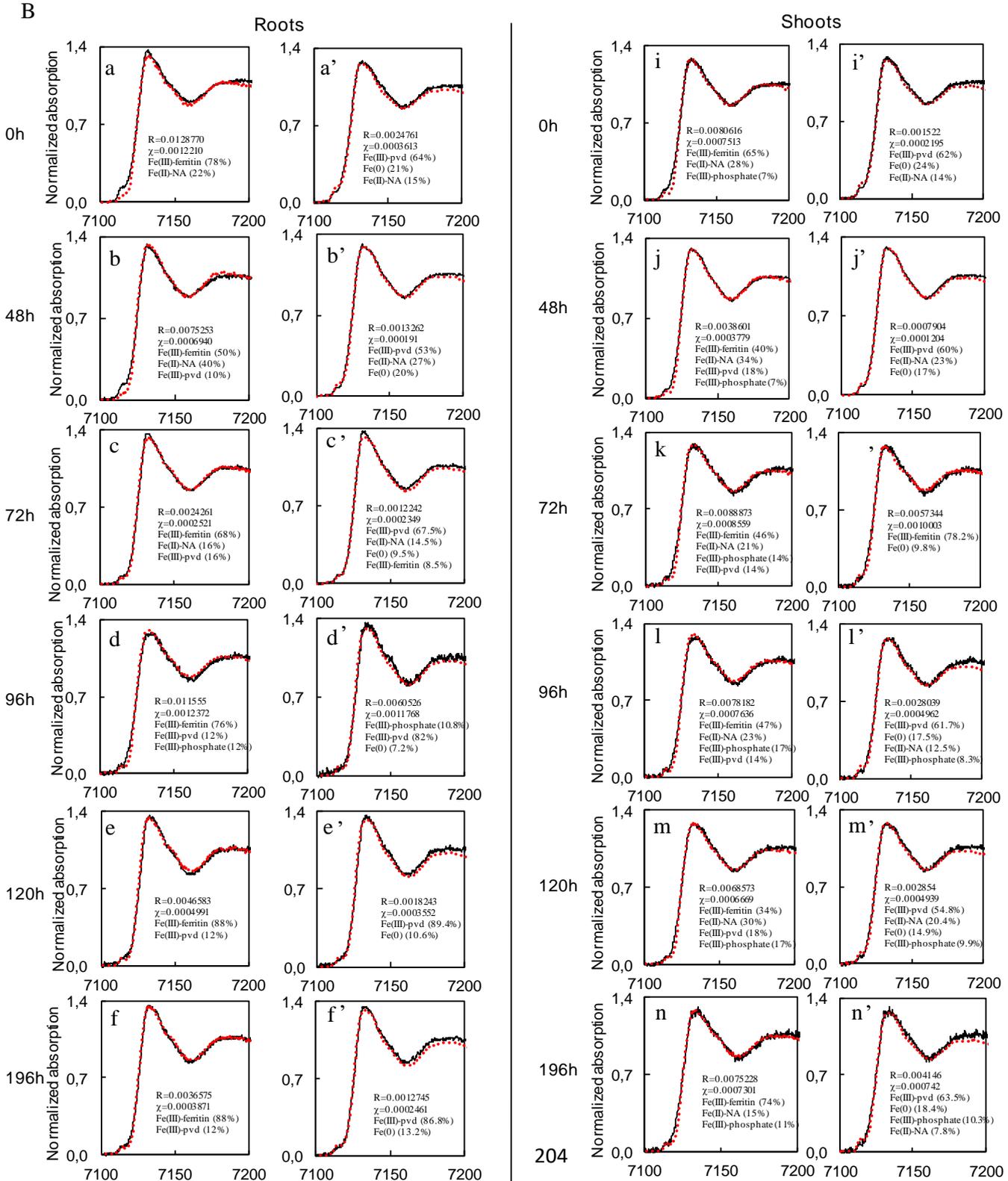
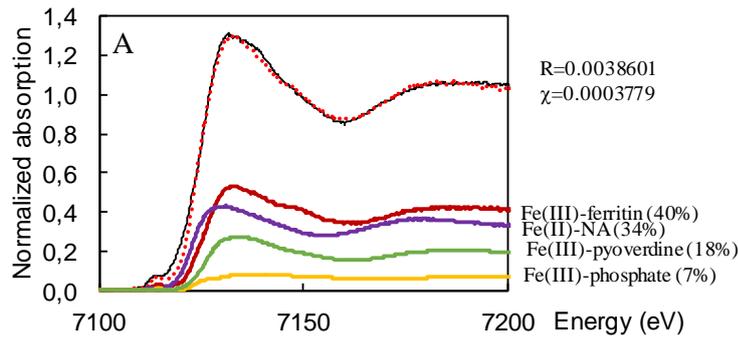


Figure S5. A. Example of a normalized Fe K-edge XANES spectrum obtained on a shoot sample 48 h after supplementation of Fe(III)-pvd (solid black line) and of a fit obtained by a linear combination of Fe(III)-ferritin, Fe(II)-Nicotianamine (Fe(II)-NA), Fe(III)-pyoverdine, and Fe(III)-phosphate reference spectra (dashed red line). The relative contribution of each of the four Fe reference compounds to the spectrum is shown in brackets on the corresponding reference spectrum, Fe(III)-ferritin (red), Fe(II)-Nicotianamine (Fe(II)-NA) (purple), Fe(III)-pyoverdine (green), and Fe(III)-phosphate (yellow). The fitting parameter (i.e. R-factor = 0.0038601 and reduced Chi-square = 0.0003779, obtained using program package ATHENA (Ravel and Newville, 2005)) indicated the goodness-of-fit. **B.** Normalized Fe K-edge XANES spectra obtained on root and shoot samples after supplementation of Fe(III)-pyoverdine (solid black line) and their corresponding best fit obtained by a linear combination of reference spectra (dashed red line) of Fe(III)-ferritin, Fe(II)-Nicotianamine (Fe(II)-NA), Fe(III)-pyoverdine and Fe(III)-phosphate reference spectra (a-n), or of Fe(III)-ferritin, Fe(II)-Nicotianamine (Fe(II)-NA), Fe(III)-pyoverdine, Fe(III)-phosphate and Fe(0) metallic (a'-n'). Fe(0), is considered to be an artifact created by sample irradiation with high intensity synchrotron X-rays (Terzano *et al.*, 2013), therefore fits without Fe(0) were used to evaluate respective representation of iron forms.

5. Discussion

Evidence for the contribution of pyoverdine to iron nutrition of *Arabidopsis* was previously reported by Vansuyt *et al.* (2007). We further analyzed the mechanisms and physiology of adaptations underlying plant iron nutrition by Fe(III)-pyoverdine (Fe(III)-pvd). An integrated approach combining X-ray absorption spectroscopy and microscopy observations was adopted to localize Fe(III)-pvd *in planta* and to assess the impact of this chelate on plant iron status and root cellular morphology.

Direct evidence for the presence of Fe(III)-pvd iron chelate, in its entirety in roots and shoots was obtained for the first time. The presence of pyoverdine (pvd) in plant roots was evidenced by NanoSIMS based on ^{15}N detection and by IEM analyses. In addition, XANES analyses demonstrated the presence of pvd in the form of iron chelate Fe(III)-pvd both in roots and shoots, indicating its uptake as an integral complex internalized in plant roots and then translocated from root to shoot. These observations represent a major step forward in our understanding of iron uptake and homeostasis *in planta*. Indeed, until now, the measurements obtained after supplementation with Fe(III)-pvd had solely revealed iron uptake, based on increased plant iron content, and pvd uptake, based on the detection of pvd labelling (^{15}N of pvd labelled with ^{15}N -labelled amino-acids and a specific antibody raised against pvd by ELISA test) (Vansuyt *et al.*, 2007). However, the presence of the entire iron chelate within the root could be questioned and its potential presence in shoots was even more elusive. In the study by Vansuyt *et al.* (2007), the presence of pvd in shoots was only suggested by ^{15}N analyses and was not supported by ELISA results. This observation was confirmed in another study (Trapet *et al.*, 2016) and might have been due to the detection limit of the ELISA method. Indeed, in both studies, 7 days after pyoverdine input, the ^{15}N concentrations in shoots were much lower than in roots, where the pvd was also immunodetected, indicating that pvd would be much less abundant in shoots than in roots and below the detection limit of the ELISA test. Nevertheless, the results described by Vansuyt *et al.* (2007) and Trapet *et al.* (2016) might also be explained by the use of labelled amino-acids from the pvd molecule as a nitrogen source within the plant. Indeed, our results showed, in agreement with these previous findings, that 7 days after pyoverdine input, Fe(III)-pvd could no longer be detected in shoots but was still detected in roots. However, our results also showed that the iron chelate could still be detected in shoots after 2 and up to 5 days after

pyoverdine input before falling below the detection limit, which would indicate that Fe(III)-pvd had been translocated from root to shoot.

Furthermore, our findings suggest that iron chelates of microbial origin could be key players in plant iron uptake and in plant iron homeostasis in the presence of other sources of iron. Indeed, No-Fe-added control plants weren't Fe-deficient as indicated by plant iron concentrations and low values of ferric-reductase activity which did not significantly differed between plants supplemented or not with iron. In our experimental conditions, Fe(III)-pvd was found to be the second or the third most frequently found form of iron in roots whereas the level of Fe(III)-citrate, which is involved in long-distance transport in xylem (Rellán-Alvarez *et al.*, 2010; Álvarez-Fernández *et al.*, 2014), was below the detection limit.

Our results reinforce the idea that the paradigm whereby plant iron acquisition is based on two strategies (I and II), is indeed an oversimplification. For *A. thaliana*, as for other dicots and non-graminaceous monocots, strategy I which involves an extracellular reduction process of Fe(III) to Fe(II) followed by Fe(II) transport across the cell membrane of root epidermal cells, is an important pathway for plant iron uptake. Vansuyt *et al.* (2007) observed iron acquisition from Fe(III)-pvd and the presence of pvd inside the roots of an *A. thaliana* mutant with an impaired Fe(II) membrane transporter (IRT1), which led to the hypothesis of the existence of an additional pathway for iron uptake based on internalization of the Fe(III)-pvd iron chelate. Our results strengthen this hypothesis by providing, for the first time, evidence of the internalization of the Fe(III)-pvd microbial iron chelate by a non-reductive process. Moreover, the observed increase in ferric-reductase activity in plants supplied with Fe(III)-pvd, does not contradict the hypothesis proposed in Yehuda *et al.*, (1996), Nagata *et al.*, (2013) and Radzki *et al.*, (2013), that iron from microbial ferri-siderophores may be internalized via the strategy I pathway. Microbial ferri-siderophores are in fact highly diverse, and their very variable stability (Guerinot and Yi, 1994) is totally dependent on the rhizosphere conditions (Robin *et al.*, 2008). Thus, the proposition that several mechanisms could be involved in plant iron acquisition from microbial ferri-siderophores, is not unreasonable. In agreement with this, Trapet *et al.* (2016) recorded an increased level of expression of the root surface ferric-reductase (FRO2) and of the Fe(II) membrane transporter (IRT1) under iron-deficient conditions in presence of pvd. They also evidenced the presence of pvd inside plant roots

indicating that induction of the strategy I pathway and internalization of microbial chelates might even occur together.

We detected the Fe(III)-pvd chelate in the cytoplasm of root epidermal cells of *A. thaliana*. This suggests that the Fe(III)-pvd complex internalized by the plant is transported by the symplastic pathway or by a coupled trans-cellular pathway involving both apoplastic and symplastic pathways (Barberon and Geldner, 2014). The detection of pvd in the central cylinder zone (i.e. beyond the Casparian strip) by immunogold labelling, strengthens the hypothesis that the symplastic pathway is involved in transporting the microbial iron chelate. Moreover, the immunogold detection of pvd in xylem and phloem tissues and presence of the Fe(III)-pvd complex in aerial parts of the plant, as detected by XANES, contribute to evidence translocation of the iron chelate from root to shoot in *A. thaliana*. These results suggest that microbial chelates could be involved in long-distance iron transport in plants and in iron homeostasis. Although ferritin was by far the commonest form of iron detected, especially in roots, the ferri-siderophore was detected in proportions comparable to those of another form of iron known to be essential in iron long-distance transport and iron homeostasis, Fe(II)-Nicotianamine (Curie *et al.*, 2009; Schuller *et al.*, 2012; Álvarez-Fernández *et al.*, 2014).

Significantly more vesicles were observed in the epidermal cells of mature zones of the root of plants supplied with Fe(III)-pvd, than in plants supplied with Fe(III)-EDTA. This increased presence of vesicles could be the result of endocytosis-mediated Fe(III)-pvd uptake by root cells. Indeed, Kazamia *et al.* (2018) recently evidenced the direct intracellular uptake of microbial ferri-siderophore by diatoms, unicellular photosynthetic algae, and showed that the non-reductive uptake of ferri-siderophores was mediated by endocytosis through the formation of vesicles.

Further studies will be necessary to better understand the role of microbial iron chelates and to describe the mechanisms involved in their uptake, transport and utilization by plants. The stability constants of pyoverdines are very high and Fe(III)-pyoverdines complexes are stable over a wide range of pH (Robin *et al.*, 2008). Plants might have adapted mechanisms to benefit from these properties, rather than being challenged, under iron deficient conditions. Indeed, the long-standing co-evolution of plants and rhizosphere bacteria, encompassing pseudomonads, has led to reciprocal beneficial interactions (Lemanceau *et al.*, 2017; Lemanceau *et al.*, 2018). It would be particularly interesting to study the fate and compare

the impact of this form of iron supply in relation to the pH and Eh properties in different compartments of the same plant, which are known to vary (Grillet *et al.*, 2014; Krohling *et al.*, 2015).

Altogether the results obtained in this integrated study mainly based on microscopy combined with X-ray absorption spectroscopy methodologies, demonstrated that under iron limited conditions a bacterial ferri-siderophore, Fe(III)-pvd : (i) is taken up as an integral complex by epidermal root cells via a non-reductive process associated with increased presence of vesicles, indicating a possible endocytosis pathway (ii) is transported via the symplastic or trans-cellular pathway to the central cylinder (iii) is translocated from root to shoot in *A. thaliana* and (iv) promotes plant iron nutrition. In addition, significant amounts of the Fe(III)-pvd iron form are found for several days in roots and shoots of plants after supplementation. Overall, these findings suggest that iron chelates of microbial origin could be key players in plant iron uptake and homeostasis.

6. Acknowledgments:

This work was supported by the 'Conseil Régional de Bourgogne', by the 'Agence de l'Environnement et de la Maîtrise de l'Énergie' and by the POSiTIF project of the Plant2Pro Carnot Institute. We are grateful to Gérard Vansuyt and Eric Bernaud for their support during the initial phase of the project. The authors acknowledge the DImaCell Imaging Facility for the use of transmission electron microscopy, sample preparation and for technical assistance. The authors thank SOLEIL Synchrotron (Gif-sur-Yvette, France) for the provision of beamtime (Project 20161166) and Nicolas Trcera and Delphine Vantelon from LUCIA Beamline for help and advice during data collection. Finally, we are grateful to the CNRS GDR *Pseudomonas* for promoting scientific interactions and to Diana Warwick for editing the English text.

7. References

- Álvarez-Fernández A, Díaz-Benito P, Abadía A, López-Millán AF, Abadía J. 2014. Metal species involved in long distance metal transport in plants. *Frontiers in Plant Science* **5**, 105.
- Avoscan L, Carrière M, Proux O, Sarret G, Degrouard J, Coves J, Gouget B. 2009. Enhanced selenate accumulation in *Cupriavidus metallidurans* CH34 does not trigger a detoxification pathway. *Applied and Environmental Microbiology* **75**, 2250-2252.
- Balk J, Schaedler TA. 2014. Iron cofactor assembly in plants. *Annual Review of Plant Biology* **65**, 125-153.
- Barberon M, Geldner N. 2014. Radial transport of nutrients: the plant root as a polarized epithelium. *Plant Physiology* **166**, 528-537.
- Bienfait HF, van den Briel W, Mesland-Mul NT. 1985. Free space iron pools in roots: generation and mobilization. *Plant Physiology* **78**, 596-600.
- Curie C, Briat JF. 2003. Iron transport and signaling in plants. *Annual Review of Plant Biology* **54**, 183-206.
- Curie C, Cassin G, Couch D, Divol F, Higuchi K, Le Jean M, Misson J, Schikora A, Czernic P, Mari S. 2009. Metal movement within the plant: contribution of nicotianamine and yellow stripe 1-like transporters. *Annals of Botany* **103**, 1-11.
- Curie C, Panaviene Z, Loulergue C, Dellaporta SL, Briat JF, Walker EL. 2001. Maize yellow stripe1 encodes a membrane protein directly involved in Fe(III) uptake. *Nature* **409**, 346-349.
- Eparvier A, Lemanceau P, Alabouvette C. 1991. Population dynamics of non-pathogenic *Fusarium* and fluorescent *Pseudomonas* strains in rockwool, a substratum for soilless culture. *FEMS Microbiology Ecology* **9**, 177-184.
- Fourcroy P, Sisó-Terraza P, Sudre D, Savirón M, Reyt G, Gaymard F, Abadía A, Abadía J, Álvarez-Fernández A, Briat JF. 2014. Involvement of the ABCG37 transporter in secretion of scopoletin and derivatives by *Arabidopsis* roots in response to iron deficiency. *New Phytologist* **201**, 155-167.
- Gibbs CR. 1976. Characterization and application of FerroZine iron reagent as a ferrous iron indicator. *Analytical Chemistry* **48**, 1197-1201.
- Grillet L, Mari S, Schmidt W. 2014. Iron in seeds - loading pathways and subcellular localization. *Frontiers in Plant Science* **4**, 535.
- Guerinot ML, Yi Y. 1994. Iron: Nutritious, Noxious, and Not Readily Available. *Plant Physiology* **104**, 815-820.
- Hartney SL, Mazurier S, Girard MK, Mehnaz S, Davis EW, Gross H, Lemanceau P, Loper JE. 2013. Ferricyanide recognition by fpv outer membrane proteins of *Pseudomonas protegens* Pf-5. *Journal of Bacteriology* **195**, 765-776.
- Ishimaru Y, Suzuki M, Tsukamoto T, et al. 2006. Rice plants take up iron as an Fe³⁺-phytosiderophore and as Fe²⁺. *The Plant Journal* **45**, 335-346.
- Jin CW, Li GX, Yu XH, Zheng SJ. 2010. Plant Fe status affects the composition of siderophore-secreting microbes in the rhizosphere. *Annals of Botany* **105**, 835-841. Correction in: **105**: 1071.
- Jin CW, You GY, He YF, Tang C, Wu P, Zheng SJ. 2007. Iron deficiency induced secretion of phenolics facilitates the reutilization of root apoplastic iron in red clover. *Plant Physiology* **144**, 278-285.
- Kazamia E, Sutak R, Paz-Yepes J, et al. 2018. Endocytosis-mediated siderophore uptake as a strategy for Fe acquisition in diatoms. *Science Advances* **4**: eaar4536.
- Kobayashi T, Nishizawa NK. 2012. Iron Uptake, Translocation, and Regulation in Higher Plants. *Annual Review of Plant Biology* **63**, 131-152.
- Krohling CA, Eutrópio FJ, Bertolazi AA, Dobbss LB, Campostrini E, Dias T, Ramos AC. 2016. Ecophysiology of iron homeostasis in plants. *Soil Science and Plant Nutrition* **62**, 39-47.
- Lefèvre F, Fourneau J, Pottier M, Baijot A, Corne T, Abadía J, Álvarez-Fernández, Boutry M. 2018. The *Nicotiana tabacum* ABC transporter NtPDR3 secretes *O*-methylated coumarins in response to iron deficiency. *Journal of Experimental Botany* **69**, 4419-4431.

- Lei GJ, Zhu XF, Wang ZW, Dong F, Dong NY, Zheng SJ.** 2014. Abscisic acid alleviates iron deficiency by promoting root iron reutilization and transport from root to shoot in *Arabidopsis*. *Plant Cell and Environment* **37**, 852-863.
- Lemanceau P, Alabouvette C.** 1991. Biological control of fusarium diseases by fluorescent *Pseudomonas* and non-pathogenic *Fusarium*. *Crop Protection* **10**, 279-286.
- Lemanceau P, Barret M, Blouin M, Mazurier S, Pivato B.** 2018. Plant-Microorganism Interactions in the Rhizosphere. In: Lemanceau P and Blouin M, eds. *Soils as a Key Component of the Critical Zone 6*. London, UK: ISTE Wiley, Ecology, 57-81.
- Lemanceau P, Barret M, Mazurier S, Mondy S, Pivato B, Fort T, Vacher C.** 2017. Plant communication with associated microbiota in the spermosphere, rhizosphere and phyllosphere. In: Becard G, ed. *How Plants Communicate with their Biotic Environment. Advances in Botanical Research*. USA: Academic Press, Elsevier. 82, 101-133.
- Lemanceau P, Bauer P, Kraemer S, Briat JF.** 2009. Iron dynamics in the rhizosphere as a case study for analyzing interactions between soils, plants and microbes. *Plant and Soil* **321**, 513-535.
- Luft JH.** 1961. Improvements in epoxy resin embedding methods. *The journal of Biophysical and Biochemical Cytology* **9**, 409-414.
- Marschner H, Römheld V.** 1994. Strategies of plants for acquisition of iron. *Plant and Soil* **165**, 261-274.
- Meyer JM, Abdallah MA.** 1978. The fluorescent pigment of *Pseudomonas fluorescens*: biosynthesis, purification and physicochemical properties. *Journal of General Microbiology* **107**, 319-328.
- Nagata T, Oobo T, Aozasa O.** 2013. Efficacy of a bacterial siderophore, pyoverdine, to supply iron to *Solanum lycopersicum* plants. *Journal of Bioscience and Bioengineering* **115**, 686-690.
- Newville M.** 2001. IFEFFIT: interactive XAFS analysis and FEFF fitting. *Journal of Synchrotron Radiation* **8**, 322-324.
- Radzki W, Gutierrez Manero FJ, Algar E, Lucas Garcia JA, Garcia-Villaraco A, Ramos Solano B.** 2013. Bacterial siderophores efficiently provide iron to iron-starved tomato plants in hydroponics culture. *Antonie van Leeuwenhoek* **104**, 321-330.
- Ravel B, Newville M.** 2005. ATHENA, ARTEMIS, HEPHAESTUS: data analysis for X-ray absorption spectroscopy using IFEFFIT. *Journal of Synchrotron Radiation* **12**, 537- 541.
- Rellán-Alvarez R, Giner-Martínez-Sierra J, Orduna J, Orera I, Rodríguez-Castrillón JA, García-Alonso JI, Abadía J, Alvarez-Fernández A.** 2010. Identification of a tri-iron(III), tri-citrate complex in the xylem sap of iron-deficient tomato resupplied with iron: new insights into plant iron long-distance transport. *Plant and Cell Physiology* **51**, 91-102.
- Reynolds ES.** 1963. The use of lead citrate at high pH as an electron -opaque stain in electron microscopy. *Journal of Cell Biology* **17**, 208-212.
- Robin A, Vansuyt G, Hinsinger P, Meyer JM, Briat JF, Lemanceau P.** 2008. Iron dynamics in the rhizosphere. Consequences for plant health and nutrition. *Advances in Agronomy* **99**, 183-225.
- Römheld V, Marschner H.** 1986. Evidence for a specific uptake system for iron phytosiderophores in roots of grasses. *Plant Physiology* **80**, 175-180.
- Schmid NB, Giehl RFH, Döll S, Mock HP, Strehmel N, Scheel D, Kong X, Hider RC, von Wirén N.** 2014. Feruloyl-CoA 6'-Hydroxylase1-Dependent coumarins mediate iron acquisition from alkaline substrates in *Arabidopsis*. *Plant Physiology* **164**, 160-172.
- Schuler M, Rellán-Álvarez R, Fink-Straube C, Abadía J, Bauer P.** 2012. Nicotianamine functions in the phloem-based transport of iron to sink organs, in pollen development and pollen tube growth in *Arabidopsis*. *The Plant Cell* **24**, 2380-2400.
- Shirley M, Avoscan L, Bernaud E, Vansuyt G, Lemanceau P.** 2011. Comparison of iron acquisition from Fe-pyoverdine by strategy I and strategy II plants. *Botany* **89**, 731-735.
- Terzano R, Alfeld M, Janssens K, Vekemans B, Schoonjans T, Vincze L, Tomasi N, Pinton R, Cesco S.** 2013. Spatially resolved (semi)quantitative determination of iron (Fe) in plants by means of synchrotron micro X-ray fluorescence. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* **405**, 3341-3350.

- Trapet P, Avoscan L, Klinguer A, Pateyron S, Citerne S, Chervin C, Mazurier S, Lemanceau P, Besson-Bard A.** 2016. The *Pseudomonas fluorescens* siderophore pyoverdine weakens *Arabidopsis thaliana* defense in favor of growth in iron-deficient conditions. *Plant Physiology* **171**, 675-693.
- Tsai HH, Rodriguez-Celma J, Lan P, Wu YC, Vélez Bermúdez I, Schmidt, W.** 2018. Scopoletin 8-hydroxylase-mediated fraxetin production is crucial for iron mobilization. *Plant Physiology* **177**, 194-207.
- Vansuyt G, Robin A, Briat JF, Curie C, Lemanceau P.** 2007. Iron acquisition from Fe-pyoverdine by *Arabidopsis thaliana*. *Molecular Plant Microbe Interactions* **20**, 441-447.
- Vantelon D, Trcera N, Roy D, et al.** 2016. The LUCIA beamline at SOLEIL. *Journal of Synchrotron Radiation* **23**, 635-640.
- Wilke M, Farges F, Petit PE, Brown Jr GE, Martin F.** 2001. Oxidation state and coordination of Fe in minerals: an FeK-XANES spectroscopic study. *American Mineralogist* **86**, 714-730.
- Winterbourn CC.** 1995. Toxicity of iron and hydrogen peroxide: the Fenton reaction. *Toxicology Letters* **82/83**, 969-974.
- Xiong H, Kakei Y, Kobayashi T, et al.** 2013. Molecular evidence for phytosiderophore-induced improvement of iron nutrition of peanut intercropped with maize in calcareous soil. *Plant Cell and Environment* **36**, 1888-1902.
- Yehuda Z, Shenker M, Römheld V, Marschner H, Hadar Y, Chen Y.** 1996. The role of ligand exchange in the uptake of iron from microbial siderophores by gramineous plants. *Plant Physiology* **112**, 1273-1280.

Bilan

Cette étude a permis d'obtenir des résultats qui supportent l'hypothèse de l'internalisation par la plante du complexe ferripyoverdine entier, sans réduction préalable à l'acquisition du fer. En effet, les résultats de spectrométrie à rayons X indiquent que le fer sous la forme du complexe ferripyoverdine serait présent dans les racines mais aussi dans les parties aériennes de la plante. Ces résultats suggèrent donc, de plus, que le chélat bactérien pourrait être impliqué dans le transport à longue distance du fer *in planta*. Les résultats obtenus avec les autres méthodes vont également dans ce sens. En effet, ils montrent que le transport de la pvd n'est pas seulement apoplasmique mais aussi symplasmique. Ils mettent en évidence le franchissement de la barrière de Caspary de la molécule microbienne et sa présence dans les vaisseaux conducteurs. En outre, il a été montré que l'apport de fer sous forme ferripyoverdine est associé à une présence fortement accrue de vésicules à la périphérie des cellules épidermiques dans les zones racinaires matures. Cette observation suggère la possible implication d'un mécanisme d'endocytose dans l'internalisation des ferrisidérophores en accord avec des résultats obtenus récemment avec des diatomées (Kazamia *et al.*, 2018). Les résultats de cette étude soutiennent donc l'hypothèse de l'existence d'un mécanisme de transport non réductif permettant aux plantes d'acquérir le fer complexé par des sidérophores microbiens tels que la pyoverdine.

**Chapitre V : Impact de différentes
pyoverdines de *Pseudomonas* spp.
fluorescents sur l'expression de gènes
impliqués dans la nutrition en fer et
l'immunité du pois**

***Manuscrit destiné à être soumis en version anglaise à une
revue restant à déterminer***

***La quantité des résultats de ce chapitre étant très importante, un travail de synthèse
supplémentaire est encore nécessaire avant de publier ces données.***

Avant-propos

L'étude de l'effet de différentes pyoverdines sur le statut en fer et le ionome de deux cultivars de pois présentée chapitre 3 a mis en évidence des effets spécifiques variant selon les types de pvds et les génotypes de pois en présence. Ce travail a aussi montré que le pois T, tolérant à la chlorose, avait une meilleure aptitude à assimiler le fer apporté sous forme de ferripyoverdine que le pois S, sensible. Par ailleurs, il a été montré que les pvds influencent l'immunité des plantes et leur balance croissance défense (Trapet *et al.*, 2016; van Loon *et al.*, 2008). De même, l'acquisition du fer via la synthèse de composés phénoliques est liée à des réactions de défenses (Zamioudis *et al.*, 2014; Romera *et al.*, 2019). En conséquence on a cherché, à travers la présente étude, à mieux comprendre comment les deux cultivars de pois S et T utilisent les différents ferrisidérophores et les effets produits par l'utilisation de ces chélats bactériens. Pour cela, l'interaction entre plante et ferripyoverdines a été analysée au niveau moléculaire par l'étude de l'effet de Fe-pvds sur la transcription de gènes du pois en relation avec le statut en fer et des ferritines présentes dans les plantes correspondantes. Les interactions entre plante et ferrisidérophores ayant eu des effets différents sur le statut en fer des plantes, on a également cherché à identifier des gènes qui pourraient servir de marqueurs pour étudier les effets des chélats microbiens.

Le travail de génomique transcriptionnelle, de définition des amorces et de qPCR a été fait avec l'aide de Grégoire Aubert (Ingénieur du au sein du pôle GEAPSI). Les discussions ont aussi été faites en collaboration avec Grégoire Aubert et Angélique Besson-Bard (MC au sein du pôle IPM). Le travail concernant l'extraction et l'analyse des ferritines a été réalisé par Jordan Rossi, doctorant encadré par Angélique Besson-Bard. En pratique, comme présenté chapitre 3, les plantes ont été cultivées *in vitro* et des apports en fer ont été effectués ou non. Les apports en fer ont été faits sous forme Fe-EDTA ou Fe-pvds. Trois Fe-pvds différentes ont été apportées : la ferripyoverdine modèle Fe-pvdC7R12 et les deux ferripyoverdines issues de *Pseudomonas* associés aux pois, Fe-pvd1T et Fe-pvd2S. Des plantes ont été prélevées 6, 12 et 24 heures après traitement afin de suivre l'expression de gènes du pois en cinétique par RT qPCR. Seize gènes ont été étudiés. Ils ont été sélectionnés sur la base de deux types de critères : (i) leur rôle décrit dans la littérature dans les stratégies d'acquisition du fer, d'homéostasie du fer, et dans les réactions de défense, et (ii) un changement important de leur expression constaté chez *Arabidopsis* après apport de la pvd modèle pvdC7R12 (Trapet *et al.*, 2015).

Impact de différentes pyoverdines de *Pseudomonas* spp. fluorescents sur l'expression de gènes impliqués dans la nutrition en fer et dans les mécanismes de défense du pois

Tristan Lurthy¹, Cécile Cantat¹, Grégoire Aubert¹, Angélique Besson-Bard¹, Jordan Rossi¹, Jean-Paul Lemaître¹, Laure Avoscan¹, Catherine Barraud¹, Philippe Lemanceau¹ and Sylvie Mazurier^{1*}

¹ Agroécologie, AgroSup Dijon, INRA, Univ. Bourgogne, Univ. Bourgogne Franche-Comté, F-21000 Dijon, France

Titre court : Pyoverdines modulent l'expression des gènes du pois

Adresse e-mail: tristan.lurthy@inra.fr, cantatcecile@yahoo.fr, gregoire.aubert@inra.fr, jplemait@u-bourgogne.fr; laure.avoscan@inra.fr; catherine.barraud@inra.fr; philippe.lemanceau@inra.fr; sylvie.mazurier@inra.fr

Nombre total de tableaux : 1

Nombre total de figures : 6

Nombre total de figures en données supplémentaires S : 3

Nombre total de références : 57

Mots clés : *Pseudomonas fluorescens*; *Pisum sativum*; pyoverdine; nutrition en fer; chlorose ferrique; défense des plantes

Correspondence: S. Mazurier, UMR 1347 Agroécologie, 17 rue Sully, BV 86510, F-21065 Dijon cedex, France

E-mail : sylvie.mazurier@inra.fr

1. Introduction

Le fer, micronutriment essentiel pour les êtres vivants, est un élément présent en abondance dans la croûte terrestre mais sa biodisponibilité dans les sols est faible comparée aux besoins des organismes qui y vivent (Robin et al., 2008; Lemanceau et al., 2009b). Les plantes et les microorganismes ont donc développé des systèmes actifs d'acquisition du fer. Les microorganismes synthétisent des sidérophores. Ces petites molécules chélatent le fer de l'environnement et les complexes ferrisidérophores sont internalisés par les microorganismes via des transporteurs membranaires spécifiques (Hider and Kong, 2010). Chez les plantes, deux stratégies d'acquisition du fer ont longtemps été décrites selon un schéma dichotomique ; la stratégie I ou stratégie de réduction utilisée par les dicotylédones et les monocotylédones non graminées et la stratégie II ou stratégie de chélation utilisée par les graminées. La stratégie I repose sur la réduction du fer ferrique (Fe^{3+}) en fer ferreux (Fe^{2+}) par une réductase ferrique (*FRO2* chez *Arabidopsis*) et sur l'incorporation de Fe^{2+} par un transporteur membranaire (*IRT1* chez *Arabidopsis*) (Curie and Briat, 2003; Kobayashi and Nishizawa, 2012). La stratégie II repose sur la chélation de Fe^{3+} par des phytosidérophores (PS, dérivés des acides muginéiques) et sur l'incorporation des chélats Fe^{3+} -PS via des transporteurs appartenant à la famille YS/YLS ('Yellow Stripe/Yellow Stripe Like') (Curie et al., 2009). Cependant, il a été montré que la stratégie I peut être retrouvée chez des plantes dites de stratégie II, et inversement (Ishimaru et al., 2006; Xiong et al., 2013; Grillet and Schmidt, 2019). De plus les plantes produisent des composés phénoliques fluorescents (CP) par la voie de synthèse des phénylpropanoïdes qui participent à l'acquisition du fer par chélation (Fourcroy et al., 2014; Schmid et al., 2014; Schmidt et al., 2014). MYB72, BGLU42 et PDR9, qui sont respectivement un facteur de transcription, une bêta-glucosidase et le transporteur membranaire ABC permettant l'excrétion des CP, sont des éléments clés de cette voie d'acquisition du fer qui est également liée aux réponses de défense de la plante (Palmer et al., 2013; Fourcroy et al., 2014; Zamioudis et al., 2014). Il a été montré que les complexes Fe^{3+} -CP mobilisent le fer de la rhizosphère qui peut ensuite être réduit et internalisé via la stratégie I (Fourcroy et al., 2016). Les CP ont aussi une activité réductrice et l'hypothèse de la formation de complexes Fe^{2+} -CP internalisés par un transporteur membranaire de chélats ('ICT, Iron Chelate Transporter') a été avancée par d'autres auteurs (Tsai and Schmidt, 2017a).

De nombreuses études ont montré que les sidérophores microbiens étaient particulièrement importants dans les interactions plante-microorganismes liées à la dynamique du fer dans la rhizosphère et dans la plante (Lurthy et al., revue destinée à, ou soumise à Agron. Sustain. Dev., présentée chapitre 1). Les pvds, sidérophores principaux synthétisés par les *Pseudomonas* spp. fluorescents, font l'objet d'une attention particulière dans les études des interactions plante-microorganismes impliquant le fer. En effet, les *Pseudomonas* sont considérés comme l'un des genres bactériens caractéristiques du microbiote des plantes (Hacquard et al., 2015; Levy et al., 2018; Banerjee et al., 2019). De plus, de nombreux *Pseudomonas* ont été décrits comme des rhizobactéries favorisant la croissance des plantes ('PGPR, Plant Growth Promoting Rhizobacteria') et la promotion de la nutrition en fer des plantes via la synthèse de sidérophores est l'un des mécanismes impliqués dans les interactions bénéfiques entre la plante et ces bactéries (Lurthy et al., revue destinée à, ou soumise à Agron. Sustain. Dev., présentée chapitre 1). En particulier il a été montré qu'en conditions de carence en fer *Arabidopsis* pouvait acquérir du fer chélaté à une pvd modèle, pvdC7R12, synthétisée par la souche C7R12 de *P. fluorescens*, de façon plus efficace que du fer apporté sous forme Fe-EDTA (Vansuyt et al., 2007). Ces auteurs ont de plus montré, en utilisant un mutant IRT1, que l'inactivation de ce transporteur membranaire de Fe²⁺ n'était pas indispensable à l'acquisition du fer apporté sous forme Fe-pvdC7R12. Ces résultats avancent l'hypothèse de l'existence d'un mécanisme, autre que celui de la stratégie I, impliqué dans l'internalisation du complexe Fe-pvd ; hypothèse également suggérée par la présence de pvdC7R12 dans les racines. Des résultats obtenus sur *Arabidopsis* en combinant l'utilisation de différentes méthodes (immunomicroscopie, spectroscopie d'absorption des rayons X) ont récemment renforcé cette hypothèse et suggéré que les complexes Fe-pvd pourraient être impliqués dans le transport du fer *in planta* (Avoscan et al., en révision pour JXB présenté chapitre 4). Une acquisition de fer plus efficace à partir de Fe-pvdC7R17 que de Fe-EDTA a également été observée pour des graminées pérennes (Shirley et al., 2011). D'autres pvds ont aussi conduit chez le trèfle au même type de résultat associé, de plus, à une importante production de composés phénoliques (Jin et al., 2010). L'élargissement de ces observations à différentes espèces végétales souligne l'importance potentielle des pvds pour la nutrition en fer des plantes. Mais les pvds constituent une famille de molécules dont la structure est variable. Environ une centaine de pvds différentes a déjà été décrite (Budzikiewicz, 2004; Meyer et al., 2008; Cézard et al., 2015). De plus, l'activité des pvds peut varier avec leur

structure. Ainsi des pvds différentes peuvent varier dans leur aptitude antagoniste à l'encontre d'un phytopathogène fongique (Robin et al., 2007). De même, différentes pvds peuvent avoir un impact variable sur les réactions de défense des plantes (van Loon et al., 2008). On peut donc s'interroger sur la variabilité de leur capacité à améliorer la nutrition en fer des plantes. Par ailleurs on sait que la plante influence la composition de son microbiote rhizosphérique et que cette influence est génotype dépendante (Compant et al., 2019). En outre, le statut en fer de la plante intervient dans cette sélection et influence la diversité des *Pseudomonas* associés à la rhizosphère et des sidérophores qu'ils produisent. En effet, il a été montré que les communautés de *Pseudomonas* associées à la rhizosphère d'un tabac transgénique surexpresser de ferritine sur-accumulant le fer étaient différentes de celles associées à la rhizosphère du tabac sauvage (Robin et al., 2006). Les souches associées au tabac sur-accumulant le fer présentaient globalement une plus forte capacité à résister à une carence en fer et les *Pseudomonas* dominants dans la rhizosphère des deux tabacs ainsi que leurs pvds étaient différents (Robin et al., 2007).

L'ensemble de ces résultats montre d'une part que les pvds impactent la nutrition en fer de certaines plantes et, d'autre part, que le statut en fer de la plante influence les types de pvds produites dans sa rhizosphère. Ils ont conduit à s'interroger sur l'impact, en retour, de pvds différentes sur la nutrition en fer de la plante. Deux études ont permis de répondre à cette question pour le pois. En effet, dans une première étude, il a été montré que les groupes de *Pseudomonas* dominants dans la rhizosphère d'un cultivar de pois tolérant à la chlorose ferrique, T, et d'un cultivar sensible, S, différaient et synthétisaient des pvds différentes, respectivement pvd1T et pvd2S (Lurthy et al., manuscrit en préparation présenté chapitre 2). Cette étude a également montré que les souches associées au pois tolérant à la chlorose ferrique (T) présentaient globalement une plus forte capacité à résister à une carence en fer à l'instar des souches recrutées par un tabac surexpresser de ferritine, étudiées par Robin et al. (2007). La comparaison des effets de pvd1T, pvd2S et pvdC7R12, une pvd modèle très étudiée, sur le statut en fer des deux cultivars de pois, T et S, a mis en évidence des variations en fonction des pvds et des cultivars dans une deuxième étude (Lurthy et al., soumis à *Frontiers in Plant Science* et présenté chapitre 3). Les résultats ont montré que le fer apporté sous forme Fe-pvd1T pouvait être acquis de façon plus efficace qu'à partir de Fe-EDTA par le cultivar de pois T et suggéré que les ferripyoverdines Fe-pvd1T et Fe-C7R12 étaient plus favorables à la nutrition en fer de ce cultivar qu'à celle du cultivar S. Sur la base des deux

études, on peut soulever l'hypothèse selon laquelle un pois tolérant à la chlorose ferrique pourrait devoir sa tolérance, au moins en partie, à une plus grande aptitude à recruter des microorganismes produisant des sidérophores favorables à sa nutrition en fer et à les utiliser.

L'objectif de cette étude est de progresser dans la connaissance des effets des différentes pvds sur la nutrition en fer du pois et d'identifier des marqueurs moléculaires potentiels de la spécificité des interactions entre la plante et les sidérophores. Pour cela, l'expression d'une sélection de gènes a été étudiée en cinétique chez les deux cultivars de pois modèles (T et S) après apport des trois ferripyoverdines ayant un impact différent sur le statut en fer des plantes (Fe-pvd1T, Fe-pvd2S et Fe-pvdC7R12). Certains des gènes étudiés ont été choisis sur la base de l'importance de leur rôle dans l'acquisition, l'homéostasie du fer et/ou les réactions de défense de la plante (*FRO1*, *RIT1*, *ORG3*, *NAS4*, *FER1*, *FER4*, *NRAMP3*, *MYB72*, *BGLU42*, *PDR9*, *PR4* et *CHIT*) (Waters, 2002; Cohen et al., 2004; Lanquar et al., 2005; van Loon et al., 2006; Yuan et al., 2008; Curie et al., 2009; Ravet et al., 2009; Fourcroy et al., 2014; Zamioudis et al., 2014; Selim et al., 2017). D'autres ont été choisis sur la base des résultats d'une étude de transcriptomique qui a mis en évidence, chez *Arabidopsis*, un effet de la pyoverdine modèle pvdC7R17 sur la balance croissance-défense de la plante en l'absence de fer (*HBI1*, *IBH1* et *PRE1*) (Trapet et al., 2016). Enfin deux gènes dont l'expression a été fortement modifiée en présence de fer et de pvdC7R12 ont également été sélectionnés (*IMA3* et *YLS9*) (Trapet, 2015). Une étude de génétique translationnelle a précédé les analyses de transcriptomique afin d'identifier des orthologues des gènes décrits pour *Arabidopsis* chez le pois lorsqu'ils n'étaient pas disponibles. Les résultats ont été discutés en fonction des effets sur le statut en fer des plantes.

2. Matériels et méthodes

2.1. Plantes et conditions de culture

Deux pois d'hiver ont été choisis pour leur comportement contrasté à résister à la chlorose ferrique (IDC-Iron Deficiency Chlorosis) au champ : Balltrap, cultivar tolérant (T) et Dexter, cultivar sensible (S) (projet PersPEAcase RAGT-INRA, P. Declerck, C. Jeudy & C. Salon; communication personnelle). Les graines récoltées au champ (sol calcaire de Champagne, Montardoise) ont été calibrées puis désinfectées par trempage 5 min dans de l'éthanol 70% puis 15 min dans une solution de hypochlorite de calcium ($\text{Ca}(\text{ClO})_2$) à 1% filtrée. La désinfection a été suivie de 3 rinçages à l'eau MilliQ stérile puis d'un trempage dans de l'eau MilliQ stérile pendant 3 heures. Les graines ont ensuite été mises à germer dans des boîtes de Pétri contenant du papier filtre, sans cendres stérile et humidifié, à température ambiante et à l'obscurité pendant 4 jours. Après germination, les plantules ont été transférées individuellement dans des tubes à essais contenant un milieu nutritif contenant 15 g.l^{-1} d'agar de Sigma A1296 agar (Sigma-Aldrich, St. Quentin Fallavier, France). La solution nutritive était du milieu Hoagland contenant 5 mM KH_2PO_4 and $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$, 2,5 mM KNO_3 , 1 mM MgSO_4 , 50 μM H_3BO_3 , 5 μM MnSO_4 , 15 μM $\text{ZnSO}_4 \cdot 7 \text{ H}_2\text{O}$, 3 μM $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2 \text{ H}_2\text{O}$, 2,5 μM $\text{KI}(\text{H}_2\text{O})_7$ et $\text{CuSO}_4 \cdot 5 \text{ H}_2\text{O}$. Les plantules ont été cultivées en conditions contrôlées en chambre de culture : 16h de jour à 23°C, 8h de nuit à 20°C, 300 $\mu\text{mole.m}^{-1}\text{s}^{-1}$, humidité 70%. Elles ont été arrosées tous les 4 jours avec de la solution nutritive Hoagland diluée 4 fois. Vingt-quatre plantules âgées de 14 jours de chaque cultivar ont été inoculées avec 8 ml de milieu Hoagland supplémenté ou non avec une source de fer : 0 Fer ajouté, Fe-EDTA, Fe-pvdC7R12, Fe-pvd1T et Fe-pvd2S. Hormis le témoin, la concentration finale de fer apporté dans les 8 ml était de 15 μM . Six plantes ont été prélevées par traitement, 6h, 12h et 24h et 14 jours après supplémentation. Les plantes ont été groupées par 2 afin d'obtenir 3 échantillons composites de 2 plantes par temps et par traitement. La concentration en fer, la biomasse de matière sèche et les ferritines des échantillons ont été mesurées sur les plantes prélevées 14 jours après supplémentation.

Pour la mesure de la biomasse de matière sèche, les racines des plantules de 28 jours ont été lavées dans de l'eau stérile pour éliminer les restes de solution nutritive et d'agar. Les racines et les parties aériennes (PA) ont été séchées séparément à 60°C jusqu'à stabilisation du poids (c.a. 72h).

2.2. Purification et préparation des sidérophores

Les pyoverdines, pvdC7R12 produite par la souche modèle *P. fluorescens* C7R12, pvd1T produite par la souche de *Pseudomonas* sp. B426 et pvd2S produite par la souche *Pseudomonas* sp. D4214 ont été obtenues à partir de cultures réalisées en milieu succinate liquide (Meyer and Abdallah, 1978) à 25°C sous agitation pendant 72h. Les pvds ont été extraites à partir du surnageant de culture en suivant le protocole de purification décrit par Hartney et al. (2013). Brièvement, le surnageant a été purifié par adsorption sur une colonne d'Amberlite XAD-4 avant d'être élué avec du méthanol 100% et réduit dans un évaporateur rotatif. Une deuxième étape de purification a été réalisée sur une colonne de LiChroprep RP- 18 rincée au préalable avec de l'EDTA et de l'eau acidifiée par de l'acide formique à pH 4. Après adsorption sur la colonne, un rinçage avec l'eau acidifiée a été effectué avant l'élution de la pvd avec du méthanol 80%. Les éluats ont été concentrés dans un évaporateur rotatif et lyophilisés avant d'être stockés à -20°C. La ferripyoverdine (Fe-pvd) a été obtenue en mélangeant la pvd extraite avec du FeCl₃ selon un ratio molaire 1:1. Les solutions de Fe-pvd ont été préparées quelques heures avant supplémentation et conservées dans le noir à 4°C.

2.3. Analyses multiélémentaires

Après séchage, les échantillons ont été broyés en poudre fine en utilisant un broyeur Retsch mixer mill mm400 homogenizer (Retsch, Eragny, France). La concentration en fer (Fe) a été évaluée par spectrométrie de masse (High Resolution Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry : HR ICR-MS, Thermo Scientific, Element 2 TM, Bremen, Germany) après une digestion acide couplée à un traitement micro-ondes des échantillons réalisés comme décrit dans Marchand et al. (2016) et modifiés comme suit. Tous les échantillons ont été enrichis avec deux solutions de standards internes, de gallium et de rhodium, pour obtenir respectivement une concentration finale de 5 et 1 µg l⁻¹, dilués dans 50 ml avec de l'eau MilliQ pour obtenir une solution contenant 2.0% (v/v) d'acide nitrique et finalement filtrés à 0,45 µm en utilisant un système de filtration en téflon (Digifiltre, SCP Science, Villebon-sur-Yvette, France).

2.4. Génomique translationnelle et conception d'amorces pour la RT-qPCR

Les 17 gènes sélectionnés pour l'étude sont présentés dans le **Tableau 1**. À l'exception de *FRO1*, *RIT1* et *CHIT*, décrits chez *P. sativum* (Waters, 2002; Cohen et al., 2004; Selim et al., 2017), les séquences protéiques et nucléotidiques des gènes d'*A. thaliana* ont été extraites à partir de la base de données TAIR ('The Arabidopsis Information Resource': <https://www.arabidopsis.org/>) et des orthologues ont été recherchés dans le génome du pois Cameor par PsCameor BLAST (Alves-Carvahlo et al., 2015). Pour tous les gènes, à l'exception de *CHIT* pour lequel les amorces décrites par Selim et al. (2017) ont été utilisées, les amorces ont été conçues avec Primer3 (<http://bioinfo.ut.ee/primer3/>) selon les critères suivants : 23/24 bases, Tm ~60°C, amplifiat de 90 à 150 bp. Les amorces ont été synthétisées par un prestataire de service (Eurogentec SA, Seraing, Belgique). Pour chaque paire d'amorces, l'efficacité a été mesurée sur une courbe étalon préparée à partir d'ADN génomique du pois Cameor. Seules les paires d'amorces avec une efficacité proche de 2 (>1,8) ont été conservées.

2.5. Extraction des ARN, synthèse des ADN complémentaires (ADNc) par transcription réverse (RT) et PCR quantitative (qPCR)

Les racines et les parties aériennes de chaque échantillon composite de plantes prélevées 6h, 12h et 24h après supplémentation en fer ont été placées séparément dans de l'azote liquide (-80°C). Chaque échantillon a été broyé dans l'azote liquide jusqu'à obtention d'une poudre fine et homogène. Les extractions d'ARN ont été effectuées avec le kit 'SV Total RNA Isolation System' (Promega, Madison, WI, U.S.A) à partir de 30 mg de broyat repris dans 175 µl de tampon de lyse fourni dans le kit et en suivant les recommandations du fabricant. Un spectrophotomètre (NanoDrop 2000, Thermo Fisher Scientific, France) a été utilisé pour évaluer la concentration des ARN et contrôler leur qualité. Un ratio de densité optique (DO) à 260 nm/ DO à 280 nm compris entre 1,8 et 2,2 a été choisi comme critère de qualité. Les échantillons ont été traités à la DNase (RQ1 RNase-Free DNase, Promega, Madison, WI, U.S.A) pour éliminer toute trace d'ADN. Les ADNc ont été obtenus avec le kit 'Reverse Transcriptase Core kit' (Eurogentec SA, Seraing, Belgique) en suivant les recommandations du fabricant. L'absence d'ADN et l'efficacité de la transcription réverse ont été contrôlées par amplification PCR d'un gène de ménage, *EF1* (**Tableau 1**). Les produits PCR ont été vérifiés par électrophorèse sur gel d'agarose. La concentration des échantillons d'ADNc a été ajustée à 5

ng/ μ l pour effectuer la qPCR. La PCR quantitative (qPCR) a été réalisée en utilisant le 'master mix SYBER green du kit GoTaq® qPCR Master Mix' (Promega, Madison, WI, U.S.A) en suivant les recommandations du fabricant. Le volume final de chaque réaction était de 8 μ l, contenait 200 nM du couple d'amorce spécifique du gène d'intérêt et 3 μ l d'ADNc. Les réactions d'amplification ont été préparées dans des plaques de 384 puits (Multi Sorenson, Salt lake city, UT, USA) puis scellées à l'aide de films (Multi Sorenson, Salt lake city, UT, USA). Chaque échantillon a été préparé en double dans une même plaque. Les amplifications ont été réalisées dans un thermocycleur LighCycler480 SW 1.5 (Roche, Roche diagnostics, Meylan, France) selon le cycle thermique suivant : 5 min à 95°C suivi de 40 cycles de 10 s à 95 °C, 1 min à 60°C. Une analyse des courbes de dissociation a été réalisée à la fin de la PCR pour vérifier la qualité des amplifications. Les résultats ont été exprimés sous la forme de Δ Ct: valeurs des cycles seuils (Ct) de chaque échantillon normalisées sur la base de l'amplification de deux gènes de ménage (*Actine* et *EF1*, **Tableau 1**) utilisés comme références, Δ Ct = Ct gène d'intérêt – Ct gène de référence.

2.6. Immunodétection des ferritines

L'extrait de protéines totales a été préparé sur les échantillons comme décrit dans Lobreaux et al. (1992). Les 3 répliques biologiques d'une même condition ont été poolés à quantité équimolaire pour former 1 seul échantillon composite. L'immunodétection de ferritines a été effectuée sur chaque échantillon composite en utilisant un antisérum de lapin polyclonal dirigé contre la protéine AtFER1 purifiée (Dellagi et al., 2005) reconnaissant les 4 isoformes de la ferritine (Ravet et al., 2009). Comme le contrôle, le gel protéique correspondant et la membrane de nitrocellulose ont été respectivement colorés au Bleu de Comassie et au Rouge Ponceau. Pour tous les traitements, une même bande correspondant à la même protéine a été choisie pour montrer que les dépôts et le transfert ont été similaires.

2.7. Analyses statistiques et traitement des données

La création des 'boîtes à moustache' et les analyses statistiques ont été réalisées sous environnement R (version 3.4.2), en utilisant les packages suivant : ggplot2 (Wickam, 2016) et Cairo (Simon Urbanek, 2005). Pour les analyses des données qPCR, les Ct supérieurs à 35 n'étant pas détectés par le thermocycleur, si l'un des trois échantillons testés pour un même

traitement était sous le seuil de détection, sa valeur a été remplacée par la moyenne des 2 autres échantillons. Lorsque 2 des 3 échantillons étaient sous le seuil de détection, le résultat pour le traitement a été considéré comme inférieur à la limite de détection (<Ld) et n'a pas été analysé statistiquement. Les données ont été testées pour leur normalité (Test de Shapiro-Wilk) et leur homoscedasticité (Test de Bartlett). Si les conditions d'utilisation étaient respectées, le test t de Student a été utilisé pour comparer les ΔC_t entre 2 traitements. Un test t de Welch a été utilisé si les variances n'étaient pas homogènes. Le test de comparaison de variance ANOVA à deux paramètres a été utilisé pour mettre en avant les effets entre cultivars et entre conditions respectivement pour un même temps (T1 ou T2 ou T3) ou pour tous les temps confondus (T1 + T2 + T3).

Tableau 1. Gènes de pois étudiés et couples d'amorces correspondants.

Gène	Accession	Accession chez <i>Arabidopsis</i>	Fonction	Amorces	bp	E (%)	Tm
<i>Actine</i> ^S	PsCam042218		Synthèse d'actine	PeaActin-F1 CTAAGGGTGAATATGATGAGTCTGG PeaActin-R1 GAGACACCAAAAAAGCAACCACATC	117	80	60
<i>EF1</i> ^S	PsCam042119		Synthèse d'un facteur d'élongation	PeaEF1-F1 AACTGAGTTAAGTCCGTTGAGAT PeaEF1-R1 GTCATCCTGGAGTTGGATGC	139	100	60
<i>RIT1</i>	PsCam030944	AT4G19690	Synthèse d'un transporteur membranaire de fer ²⁺	PeaRIT1-F1 TGATTGCTTAATGGATCATCTGC PeaRIT1-R1 ATACTACCCTGCATCCTCTACTC	118	100	60
<i>FRO1</i>	PsCam010941	AT1G01580	Synthèse d'une réductase ferrique	PeaFro1-F1 AAACAGATTCAGAACATGGAAGGG PeaFro1-R1 ATTGGTAGTTTCAACAAGCGACTG	117	87	60
<i>ORG3</i>	PsCam017277	AT3G56980	Synthèse d'un facteur de transcription	PeaOrg3-F1 TGAGAGGCAGCTAAGTAATCAAGT PeaOrg3-R1 ACTACAATAAGACCCAATCCCC	105	100	60
<i>PDR9</i>	PsCam016885	AT3G53480	Synthèse d'un transporteur membranaire de coumarines	PeaPdr9-F1 GGAGACATGGACAAGGAAATACTC PeaPdr9-R1 CCACAACACTTAATCTGTCATGCC	103	100	60
<i>NAS4</i>	PsCam050375	AT1G56430	Synthèse d'un chélat transporteur de fer <i>in planta</i>	PeaNas4-F1 AGGCCTTGGTTCTATGATCCTACC PeaNas4-R1 AAAGTAAATCAGCAAGGGAGTGAG	104	98	60
<i>FER1</i>	PsCam050313	AT5G01600	Synthèse d'une protéine de stockage du fer	PeaFer1-F1 TCCTCTGTTTCTTAGCTCGTCA PeaFer1-R1 ACCGTTGTCCTATCAAAGTATG	130	88	60
<i>FER4</i>	PsCam058026	AT2G40300	Synthèse d'une protéine de stockage du fer	PeaFer4-F1 AAAACTCCTTAACCTGCACAGTG PeaFer4-R1 CTTTGCCAACTCTTCTAAGCTGAG	147	94	60
<i>NRAMP3</i>	PsCam037231	AT2G23150	Synthèse d'un transporteur pour le déstockage du fer de la vacuole	PeaNramp3-F2 CTCAATCGAAGACCACCAGGAGAG PeaNramp3-R2 TATCCTTTAGCAGCATGTCATGTTTC	101	80	60

<i>IMA3</i>	PsCam055494	AT2G30766	Synthèse d'un peptide signal	PeaIMA3-F1 TGAAGGTTACGGTAATTGGTTTGG PeaIMA3-R1 TCTCGTCGCATCATCATCATCTC	137	90	60
<i>MYB72</i>	PsCam038838	AT1G56160	Synthèse d'un facteur de transcription régulant BGLU42	PeaMyb72-F1 GCAAGAAATTGACCCTCATGAGGC PeaMyb72-R1 CTTTTTCCCTCTCAACCTATTGC	95	83	60
<i>BGLU42</i>	PsCam043081	AT5G36890	Synthèse d'une bêta-glucosidase	PeaBGlU42-F1 GTTATACGAAACGCTTTGGATTGG PeaBGlU42-R1 CTCTCTTTACCCTCCTGTTGC	128	100	60
<i>HBI1</i>	PsCam000831	AT2G18300	Synthèse d'expansine	PeaHbi1-F2 GCTAGCAATCTAAAGATCGAGATGC PeaHbi1-R2 TCTTGATGATAAGAGGCATTTGGAG	90	100	60
<i>PRE1</i>	PsCam003183	AT5G39860	Synthèse d'un inhibiteur de l'inhibiteur de HBI1	PeaPre1-F1 CAAGGTATCAGCATCTAAGGTTTC PeaPre1-R1 GCTTCTGATAATATTAGCCTCTGGA	145	86	60
<i>IBH1</i>	nd	AT2G43060	Inhibiteur de IBH1				
<i>PR4</i>	PsCam001843	AT3G04720	Synthèse d'une protéine de défense	PeaPr4-F1 TTGTAGATCAATGCAGCAATGGAG PeaPr4-R1 CTCACAATAAGATGTCCCTGTTGG	103	100	60
<i>YLS9</i>	PsCam014209	AT2G35980	Synthèse d'une protéine de défense	PeaYsl9-F1 AGGATTAGGTTTAAGCTGGGAGTG PeaYsl9-R1 ATCAACGATCCCAGTCACACTTG	148	93	60
<i>CHIT*</i>	PsCam001307	AT2G43570	Synthèse de chitinase	PeaChit-F1 ATCTTGGAACACTACAACACTACGGACC PeaChit-R1 AAGGACACTGTAGGATCATTAGCC	128	84	60

bp: paires de bases; E: Efficacité des amorces exprimée en pourcentage d'une valeur d'amplification théorique; Tm: Température d'hybridation des amorces. \$, Alves-Carvalho et al. (2015) ;*, Selim et al. (2017).

3. Résultats

3.1. Génomique translationnelle

Parmi les 17 gènes choisis pour l'étude, 3 ont été décrits chez *P. sativum* : *FRO1*, *RIT1* et *CHIT* (Waters, 2002; Cohen et al., 2004; Selim et al., 2017). Une étude de génétique translationnelle a été entreprise afin d'identifier chez le pois les orthologues des 14 autres gènes décrits chez *A. thaliana* et de générer des amorces pour étudier leur expression (*ORG3*, *FER1*, *FER4*, *NAS4*, *IMA3*, *NRAMP3*, *MYB72*, *BGLU42*, *PDR9*, *HBI1*, *IBH1*, *PRE1*, *YLS9* et *PR4*). Pour chacun de ces gènes à l'exception d'*IBH1*, un orthologue a été identifié dans le génome de *P. sativum* cv. *Cameor*, récemment publié (Kreplak et al., 2019). Le nom des gènes d'*Arabidopsis* a été utilisé pour désigner les orthologues correspondants du pois.

3.2. Expression de gènes

L'expression de 16 gènes a été étudiée pour deux cultivars de pois (S, sensible et T, tolérant à la chlorose ferrique) 6, 12 et 24 heures après avoir apporté, ou non, du fer sous 4 formes différentes, aux plantes cultivées *in vitro*. Le fer a été apporté sous forme d'un chélat chimique (Fe-EDTA) ou sous forme de 3 chélats bactériens formés chacun avec une pyoverdine différente (Fe-pvdC7R12, Fe-pvd1T et Fe-pvd2S). Les 3 pyoverdines utilisées sont (i) pvdC7R12 synthétisée par la souche modèle *P. fluorescens* C7R12, (ii) pvd1T la pyoverdine la plus synthétisée par les *Pseudomonas* associés au pois T et produite par *Pseudomonas* sp B426, et (iii) pvd2S la pyoverdine la plus synthétisée par les *Pseudomonas* associés au pois S et produite par *Pseudomonas* sp D4214. Parmi les gènes, 3 sont essentiels pour l'acquisition du fer par la stratégie I (*ORG3*, *FRO1* et *RIT1*), 2 sont impliqués dans la signalisation et/ou le transport du fer *in planta* (*IMA3*, *NAS4*), 3 sont impliqués dans le stockage ou la remobilisation du fer stocké (*FER1*, *FER4* et *NRAMP3*), 2 sont impliqués dans la régulation de la balance croissance/défense de la plante (*HBI1* et *PRE1*), et 6 sont impliqués dans les réactions de défense de la plante (*YLS9*, *CHIT1*, *PR4*, *MYB72*, *BGLU42* et *PDR9*). *MYB72*, *BGLU42* et *PDR9* sont aussi impliqués dans l'acquisition du fer via la production de composés phénoliques fluorescents.

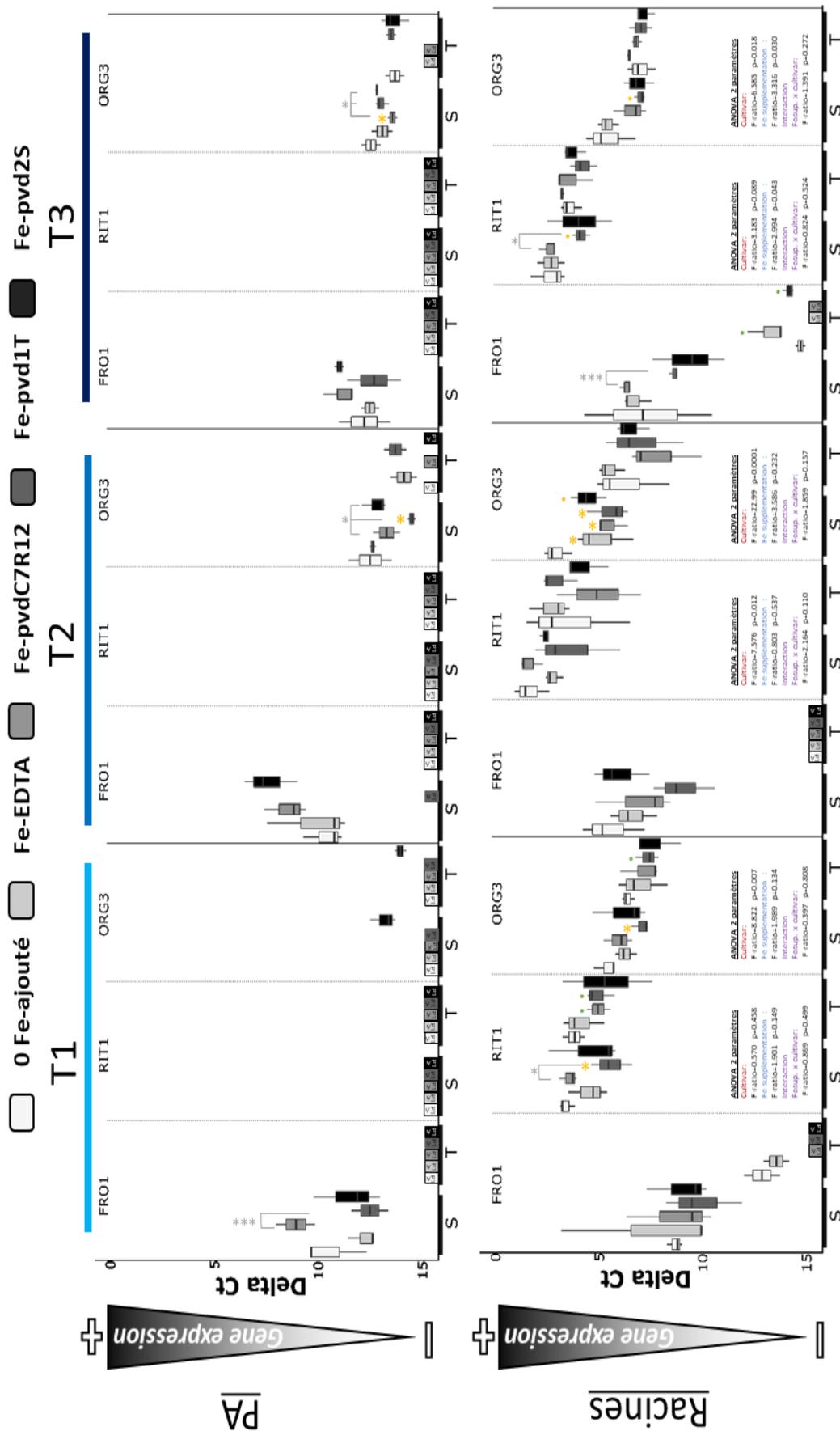


Figure 1. Expression de *FRO1*, *RIT1* et *ORG3* chez les pois de deux cultivars, S, sensible et T, tolérant à la chlorose ferrique en réponse à différents apports en fer. Le fer a été apporté sous forme Fe-EDTA; Fe-pvd7R12; Fe-pvd1T et Fe-pvd2S, ou n'a pas été apporté, 0 Fe-ajouté. Les données ont été obtenues par RT-PCR quantitative à partir d'échantillons récoltés 6h (T1), 12h (T2) et 24h (T3) après traitement. PA, partie aérienne. Delta Ct, Ct gène d'intérêt – (moyenne des Ct de 2 gènes de ménage). <Ld, valeurs de Ct sous le seuil de détection. Les différences significatives par rapport à la condition 0 Fe-ajouté ont été déterminées par un test t de Student. ; p <0,1, * ; p<0,05; ** , p<0,01; *** , p<0,001. Les niveaux de signification sont en jaune pour le pois S et en vert pour le pois T. Les résultats des ANOVAS à deux paramètres ont été présentés lorsque des différences significatives ont été observées.

3.2.1 Acquisition du fer via la stratégie I

Dans les parties aériennes, le niveau d'expression d'*ORG3* détecté était faible ou nul, et aucune différence importante entre les cultivars ou entre les traitements n'a été détectée (**Figure 1**). Aucune expression de *FRO1* n'a été détectée pour le pois T. Une expression faible de *FRO1* a été détectée pour le pois S mais sans différence entre les traitements. Pour *RIT1* aucune expression n'a été détectée.

Dans les racines, l'expression d'*ORG3* était globalement plus importante pour le pois S que pour le pois T pour les 3 temps de la cinétique (6h-F=8.83, $p<0.01$; 12h-F=17.54, $p<0.001$, 24h- F=7.34, $p=0.013$) (**Figure 1**). Pour ce cultivar, des différences d'expression entre les traitements ont été observées. Six heures après apport de fer, l'expression d'*ORG3* est significativement plus faible que celle du témoin pour l'une des ferripyoverdines (Fe-pvd1T). Après 12h, le niveau d'expression de ce gène reste plus faible que celui du témoin pour cette ferripyoverdine et la même différence est aussi observée pour Fe-pvdC7R12 et Fe-EDTA.

L'expression de *FRO1* diffère nettement entre les cultivars (**Figure 1**). Ce gène est plus fortement exprimé chez le pois S et l'est pour tous les traitements aux trois temps de la cinétique. On observe également, que 12h après apport de fer l'expression de *FRO1* est significativement plus faible que celle du témoin pour Fe-pvd1T. Pour le pois T, *FRO1* est faiblement exprimé et son expression n'est détectable que 6h et 24h après traitement pour les témoins sans fer ajouté et les apports de Fe-EDTA. L'expression de *FRO1* n'a pas été détectée en présence des ferripyoverdines à l'exception de Fe-pvd2S près 24h.

Une forte expression de *RIT1* a été détectée pour les deux cultivars de pois et son expression a été globalement plus forte pour S que pour T de façon significative 12h après traitement (**Figure 1**). Six heures après apport de fer, l'expression de *RIT1* était significativement plus faible que celle du témoin pour Fe-pvd1T.

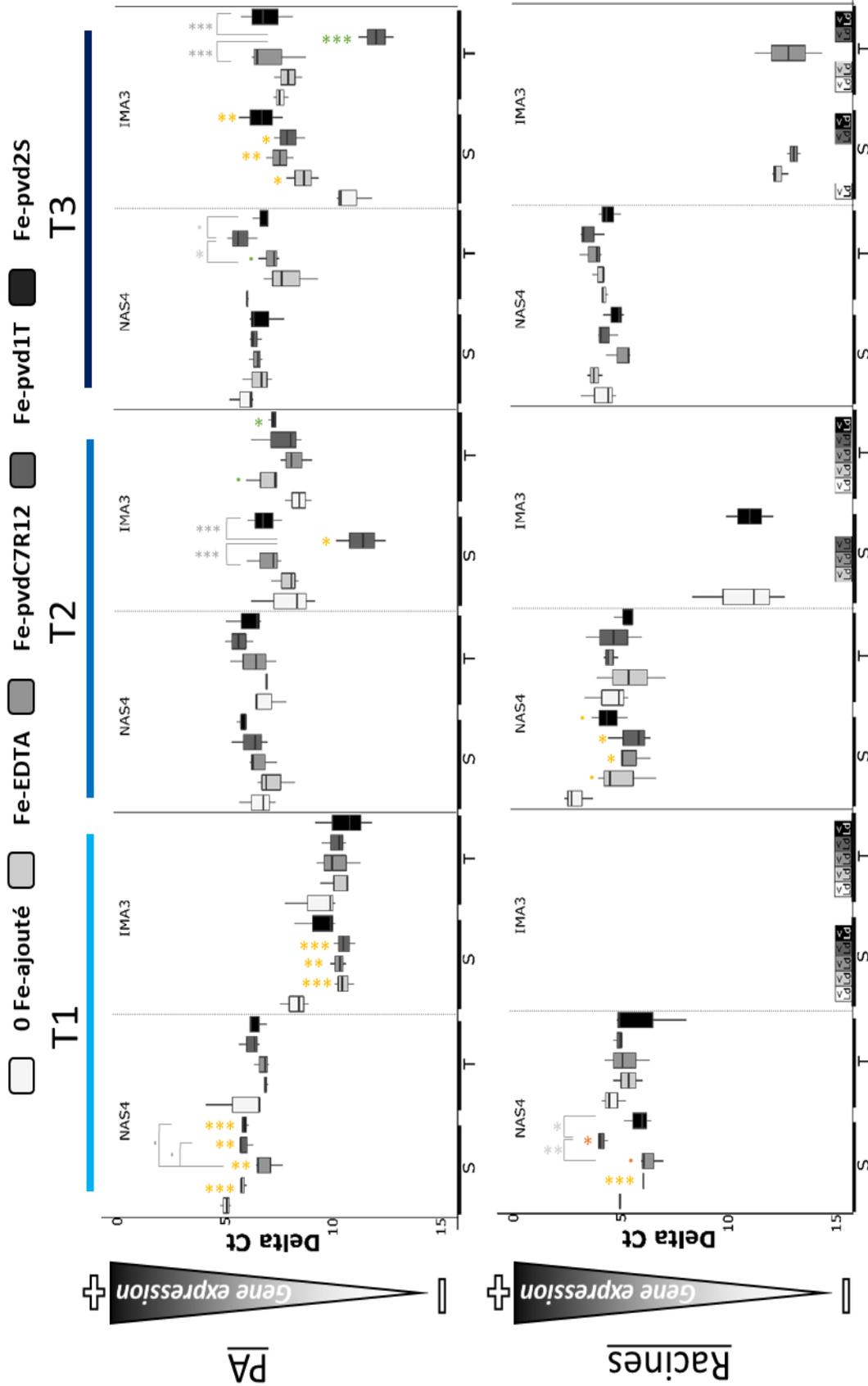


Figure 2. Expression de *NAS4* et *IMA3* chez les pois de deux cultivars, S, sensible et T, tolérant à la chlorose ferrique en réponse à différents apports en fer. Le fer a été apporté sous forme Fe-EDTA; Fe-pvdC7R12; Fe-pvd1T et Fe-pvd2S, ou n'a pas été apporté, 0 Fe-ajouté. Les données ont été obtenues par RT-PCR quantitative à partir d'échantillons récoltés 6h (T1), 12h (T2) et 24h (T3) après traitement. PA, partie aérienne. Delta Ct, Ct gène d'intérêt – (moyenne des Ct de 2 gènes de ménage). <Ld, valeurs de Ct sous le seuil de détection. Les différences significatives par rapport à la condition 0 Fe-ajouté ont été déterminées par un test t de Student. ; p < 0,1, *; p < 0,05; ** p < 0,01; *** p < 0,001. Les niveaux de signification sont en jaune pour le pois S et en vert pour le pois T. Lorsque l'homoscédasticité n'était pas respectée, un test de Welch a été effectué. Les niveaux de signification sont en orange pour le pois S et en rouge pour le pois T.

3.2.2 Signalisation et/ou transport du fer

Dans les parties aériennes, le niveau d'expression d'*IMA3* détecté a beaucoup varié en fonction des cultivars, des traitements, et du temps (**Figure 2**). Pour le cultivar S, après 6h, le niveau d'expression le plus important a été observé lorsqu'aucun apport de fer n'a été réalisé et il était significativement plus faible pour les traitements Fe-EDTA, Fe-pvdC7R12 et Fe-pvd1T. Après 12h, le niveau d'expression d'*IMA3* a augmenté pour tous les apports en fer et rejoint le niveau du témoin sans fer ajouté sauf pour Fe-pvd1T. Pour cette ferripyoverdine, l'expression a été réprimée et était significativement plus faible que celle observée pour tous les autres traitements. Après 24h, l'expression d'*IMA3* a augmenté et était significativement supérieure au témoin pour tous les apports en fer y compris pour Fe-pvd1T dont l'expression a donc très fortement augmenté entre 12 et 24h. On peut noter que le niveau d'expression du témoin sans fer ajouté a très peu évolué entre 6 et 24h. Pour le cultivar T, aucune différence entre les traitements n'a été détectée après 6h. Après 12h, seuls les apports en Fe-EDTA et en Fe-pvd2S ont induit une expression du gène supérieure à celle observée pour le témoin. Après 24h, on a observé des résultats comparables à ceux obtenus 12h avant pour le pois S ; l'expression d'*IMA3* a été réprimée pour Fe-pvd1T et était significativement plus faible que celle observée pour tous les autres traitements. Contrairement à ce qui a été observé pour le pois S, le niveau d'expression du témoin a progressé graduellement au cours du temps comme celui des autres traitements, à l'exception de Fe-pvd1T.

Des variations moins importantes ont été observées dans l'expression du gène *NAS4* (**Figure 2**). Là encore, une différence a été observée entre les cultivars de pois. Pour le pois S, 6 heures après traitement, l'expression de *NAS4* était plus faible pour tous les apports en fer en comparaison du témoin sans apport. Aucune différence n'a ensuite été notée. Pour le pois T, c'est après 24h que l'expression de *NAS4* était plus faible pour les apports en fer en comparaison du témoin sans apport, à l'exception du traitement Fe-pvd1T.

Dans les racines, *IMA3* n'était pas ou très faiblement exprimé (**Figure 2**). Son expression n'a été détectée pour le pois S qu'après 12 heures pour le témoin sans apport de fer et apport de Fe-pvd2S, et après 24 heures pour Fe-EDTA et Fe-pvdC7R12. Pour le pois T, la seule expression détectée l'a été pour les plantes ayant reçu Fe-pvdC7R12 24h après le traitement.

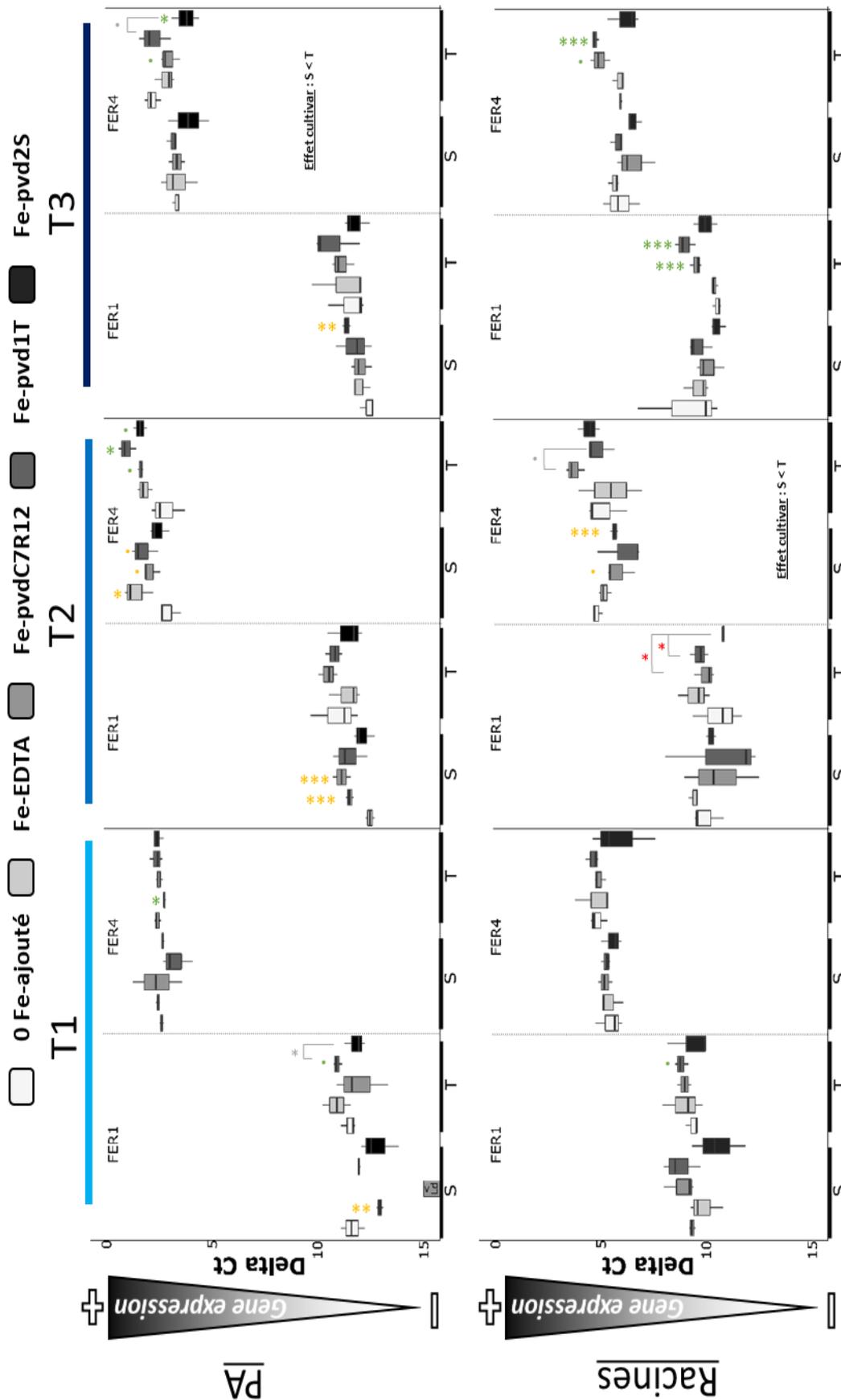


Figure 3. Expression de *FER1* et *FER4* chez les pois de deux cultivars, S, sensible et T, tolérant à la chlorose ferrique en réponse à différents apports en fer. Le fer a été apporté sous forme Fe-EDTA; Fe-pvdC7R12; Fe-pvd1T et Fe-pvd2S, ou n'a pas été apporté, 0 Fe-ajouté. Les données ont été obtenues par RT-PCR quantitative à partir d'échantillons récoltés 6h (T1), 12h (T2) et 24h (T3) après traitement. PA, partie aérienne. Delta Ct, Ct du gène d'intérêt - (moyenne des Ct de 2 gènes de ménage). <Ld, valeurs de Ct sous le seuil de détection. Les différences significatives par rapport à la condition 0 Fe-ajouté ont été déterminées par un test t de Student. ; p < 0,1, *; p < 0,05; ** p < 0,01; *** p < 0,001. Les niveaux de signification sont en jaune pour le pois S et en vert pour le pois T. Lorsque l'homoscédasticité n'était pas respectée, un test de Welch a été effectué. Les niveaux de signification sont en orange pour le pois S et en rouge pour le pois T.

L'expression de *NAS4* était de niveau comparable pour les deux cultivars de pois (**Figure 2**). Quel que soit le temps de prélèvement, aucune différence entre les traitements n'a été observée pour le pois T. En revanche, pour le pois S, on a observé après 6 heures des variations d'expression comparables à celles observées dans les parties aériennes du pois T après 24 heures ; l'expression de *NAS4* était plus faible pour les apports en fer en comparaison du témoin sans apport à l'exception du traitement Fe-pvd1T. Après 12 heures, l'expression après apport de Fe-pvd1T a baissé et l'expression de *NAS4* était plus faible que celle du témoin sans fer pour tous les apports en fer. Après 24 heures, aucune différence significative entre les traitements n'a plus été détectée.

3.2.3 Stockage et remobilisation du fer stocké

L'expression de *NRAMP3* ayant très peu varié, les résultats correspondants n'ont pas été présentés.

Dans les parties aériennes et pour les 2 cultivars de pois, le niveau d'expression de *FER1* était globalement faible alors que celui de *FER4* était élevé (**Figure 3**). Six heures après traitement, on a observé peu de variation dans l'expression de ces 2 gènes. Douze heures après les traitements, des variations ont été observées dans l'expression de *FER4*. Une augmentation de l'expression a été observée pour le pois S avec Fe-EDTA et pour le pois T avec Fe-pvd1T. Après 24 heures, le niveau d'expression de *FER4* était globalement plus important pour le pois T que pour le pois S pour lequel aucune variation entre les traitements n'a été observée. En revanche, pour le pois T, une expression plus faible que celle des autres traitements a été observée avec la ferripyoverdine Fe-pvd2S. Pour le pois S, on a observé une augmentation de l'expression de *FER1* avec Fe-pvd2S.

Dans les racines, comme dans les parties aériennes et pour les 2 cultivars de pois, le niveau d'expression de *FER1* était globalement plus faible que celui de *FER4* (**Figure 3**). De même, 6 heures après traitement, on a observé peu de variation dans l'expression de ces 2 gènes, et après 12 heures une modification a été observée dans l'expression de *FER4* ; pour le pois S, une expression plus faible que celle des autres traitements a été observée avec la ferripyoverdine Fe-pvd2S. Après 24 heures, le niveau global d'expression de *FER1* et *FER4* était plus élevé pour le pois T. Pour ce pois, l'expression des gènes codant les 2 ferritines était significativement supérieure à celle des autres traitements pour Fe-pvdC7R12 et Fe-pvd1T.

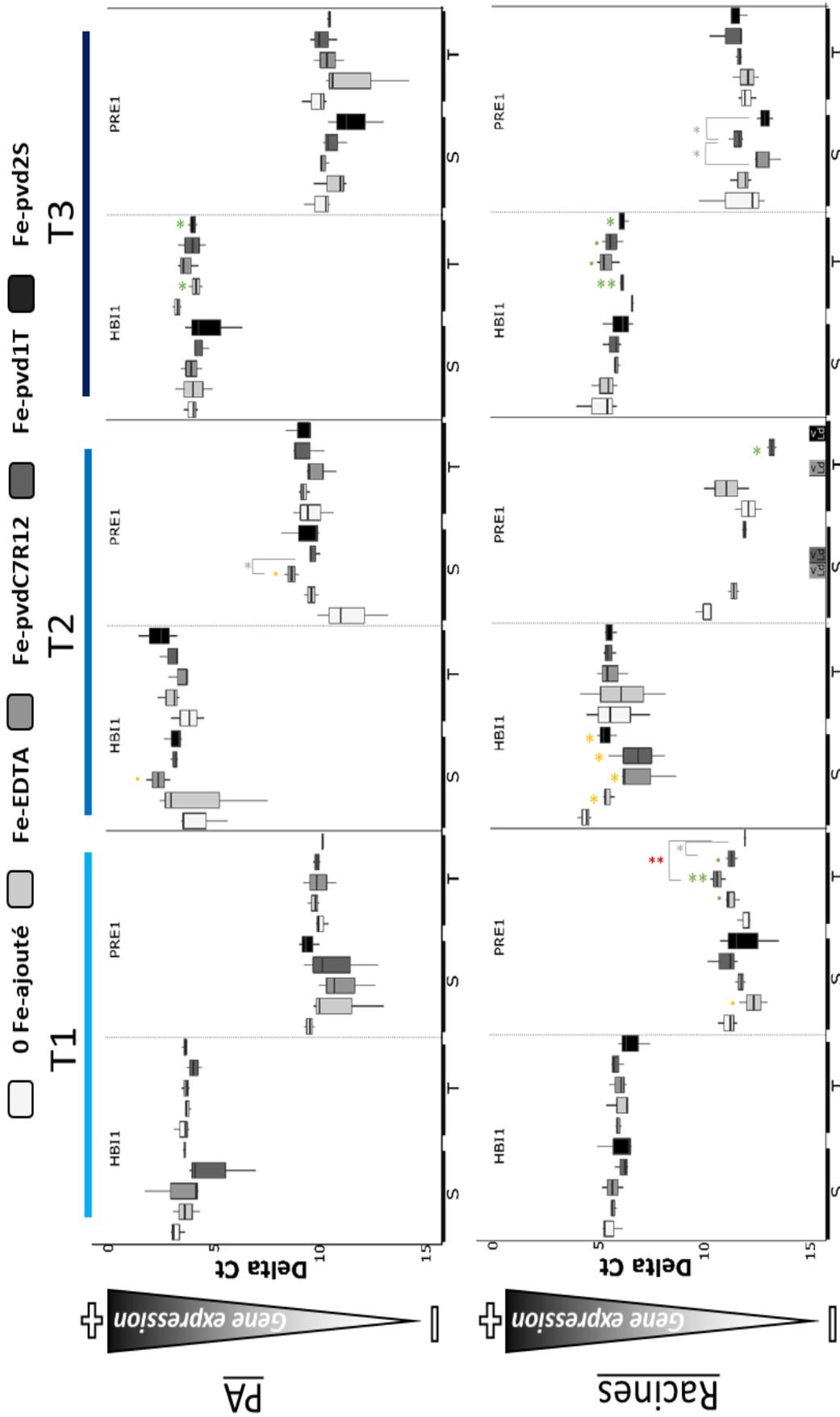


Figure 4. Expression de *HBI1* et *PRE1* chez les pois de deux cultivars, S, sensible et T, tolérant à la chlorose ferrique en réponse à différents apports en fer. Le fer a été apporté sous forme Fe-EDTA; Fe-pvdC7R12; Fe-pvd11T et Fe-pvd2S, ou n'a pas été apporté, 0 Fe-ajouté. Les données ont été obtenues par RT-PCR quantitative à partir d'échantillons récoltés 6h (T1), 12h (T2) et 24h (T3) après traitement. PA, partie aérienne. Delta Ct, Ct du gène d'intérêt – (moyenne des Ct de 2 gènes de ménage). <Ld, valeurs de Ct sous le seuil de détection. Les différences significatives par rapport à la condition 0 Fe-ajouté ont été déterminées par un test t de Student. ; $p < 0,1$, * ; $p < 0,05$; ** ; $p < 0,001$. Les niveaux de signification sont en jaune pour le pois S et en vert pour le pois T. Lorsque l'homoscédasticité n'était pas respectée, un test de Welch a été effectué. Les niveaux de signification sont en orange pour le pois S et en rouge pour le pois T.

3.2.4 Régulation de la balance croissance-défense

Dans les parties aériennes comme dans les racines, pour les 2 cultivars de pois et pour tous les traitements, le niveau d'expression observé pour *HBI1* était toujours supérieur à celui de *PRE1* (**Figure 4**). On peut cependant remarquer que 6 heures après les traitements, dans les racines du pois T, le niveau d'expression de *PRE1* a été significativement augmenté par Fe-pvdC7R12 par comparaison au témoin sans fer ajouté. Toujours pour le pois T, après 24 heures, tous les apports de fer ont induit une augmentation de l'expression de *HBI1* alors que pour le pois S, à l'inverse, c'est une diminution qui a été observée après 12 heures pour ces traitements.

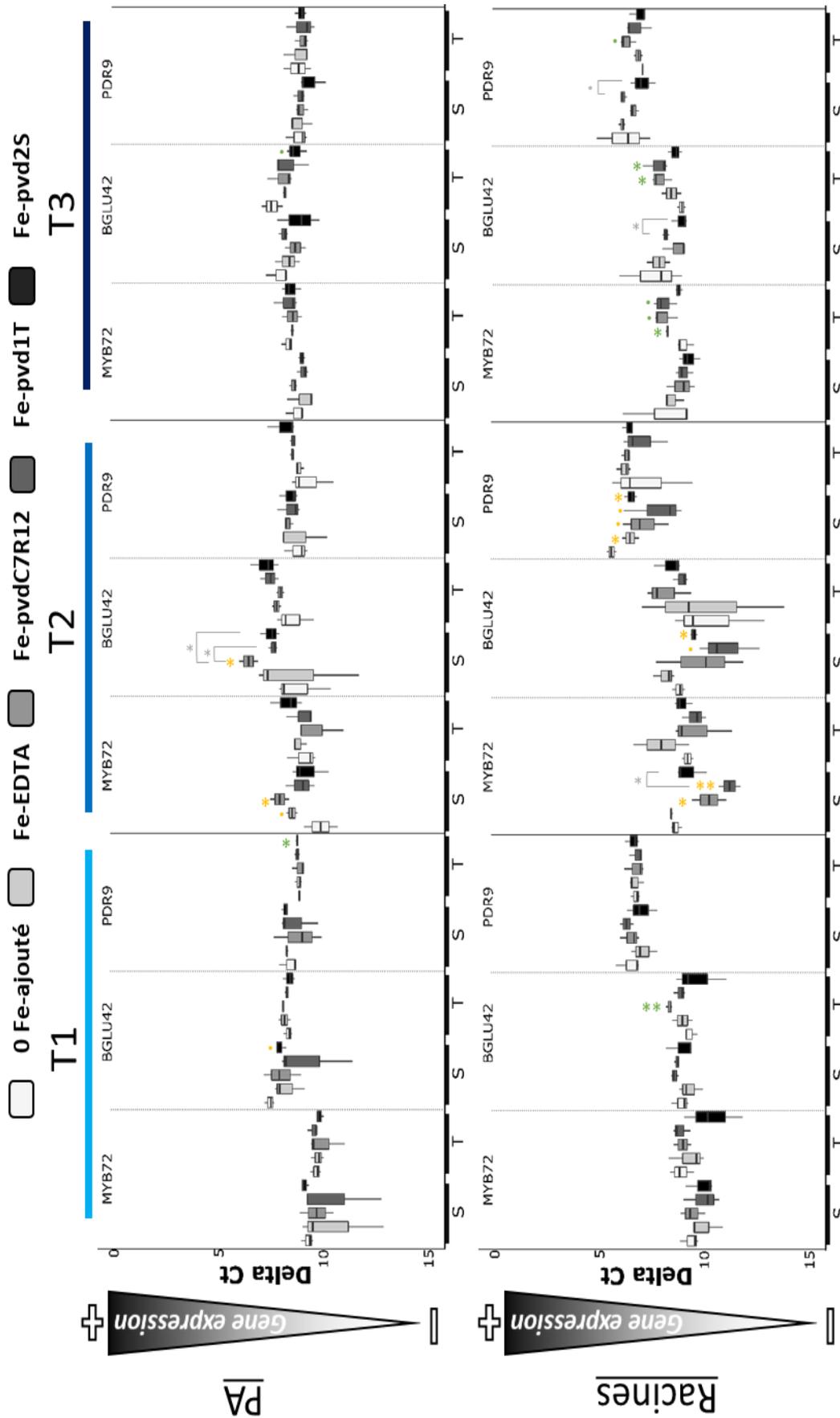


Figure 5. Expression de *MYB72*, *BGLU42* et *PDR9* chez les pois de deux cultivars, S, sensible et T, tolérant à la chlorose ferrique en réponse à différents apports en fer. Le fer a été apporté sous forme Fe-EDTA; Fe-pvdC7R12; Fe-pvd1T et Fe-pvd2S, ou n'a pas été apporté, 0 Fe-ajouté. Les données ont été obtenues par RT-PCR quantitative à partir d'échantillons récoltés 6h (T1), 12h (T2) et 24h (T3) après traitement. PA, partie aérienne. Delta Ct gène d'intérêt – (moyenne des Ct de 2 gènes de ménages). <Ld, valeurs de Ct sous le seuil de détection. Les différences significatives par rapport à la condition 0 Fe-ajouté ont été déterminées par un test t de Student. ; p <0,1, * ; p <0,05; ** p <0,01; *** p <0,001. Les niveaux de signification sont en jaune pour le pois S et en vert pour le pois T.

3.2.5 Synthèse de composés phénoliques fluorescents et réactions de défense

Dans les parties aériennes des 2 cultivars de pois, l'expression de *MYB72*, *BGLU42* et *PDR9*, gènes impliqués à la fois dans la défense et la synthèse de composés phénoliques, a été détectée à un niveau équivalent et aucune variation significative n'a été observée (**Figure 5**).

Dans les racines, pour le pois T, peu de variations de l'expression de *MYB72* et *PDR9* ont été observées (**Figure 5**). Pour *MYB72* on a seulement pu noter que 24 heures après traitement, l'expression du gène tendait à augmenter pour tous les apports de fer mais seule l'augmentation provoquée par Fe-EDTA s'est différenciée significativement du témoin. Pour le pois S, Des variations dans l'expression de ces 2 gènes ont été observées 12 heures après traitement. L'expression de *MYB72* a été réprimée pour Fe-pvdC7R12 et Fe-pvd1T et l'expression de *PDR9* a diminué pour tous les apports de fer. Concernant l'expression de *BGLU42*, on a noté son augmentation 6 heures après apport de Fe-pvdC7R12 et 24 heures après apport de Fe-pvdC7R12 et Fe-pvd1T pour le pois T. Pour le pois S une diminution a été observée 12 h après apport pour les ferripyoverdines.

Dans les parties aériennes, l'expression des autres gènes de défense étudiés a aussi varié différemment en fonction du cultivar de pois, du traitement et du temps (**Figure 6**). L'expression d'*YLS9* a été augmentée par les apports de fer 6 heures après traitement pour le pois T alors que pour S, seule Fe-pvd2S a induit une augmentation d'expression. Une répression de l'expression est observée après 24 heures pour Fe-pvd1T chez le pois S et pour Fe-EDTA pour T. L'expression de *PR4* a été significativement réprimée après 24 heures par Fe-EDTA chez le pois T mais aucune variation significative n'a été observée pour S. L'expression de *CHIT* a été significativement augmentée chez le pois T 6 heures après apport de Fe-pvd1T et diminuée après 12 heures par Fe-EDTA. Chez S, l'expression de ce gène a été significativement diminuée par 2 ferripyoverdines, Fe-pvdC7R12 et Fe-pvd2S, 24 heures après apport.

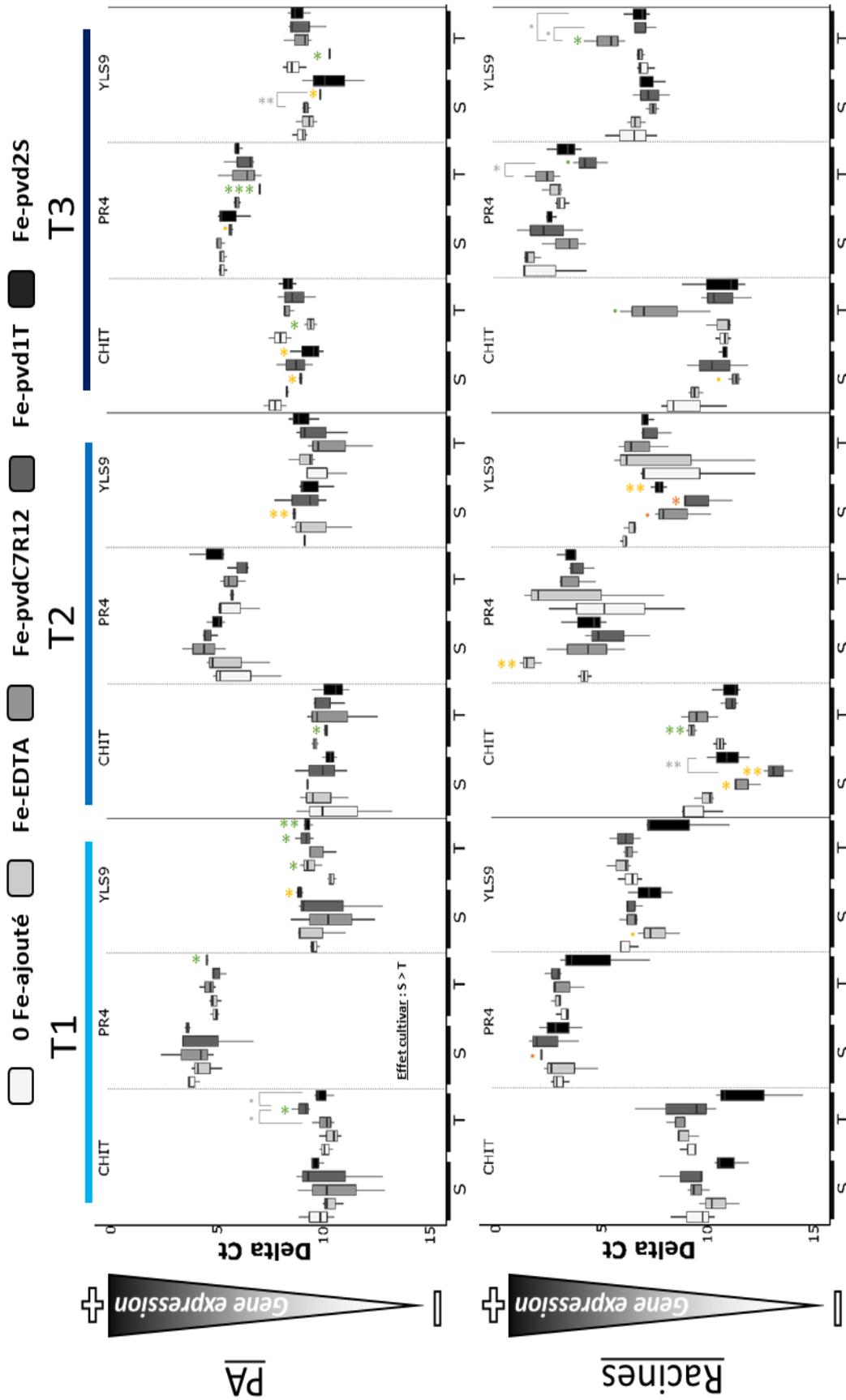
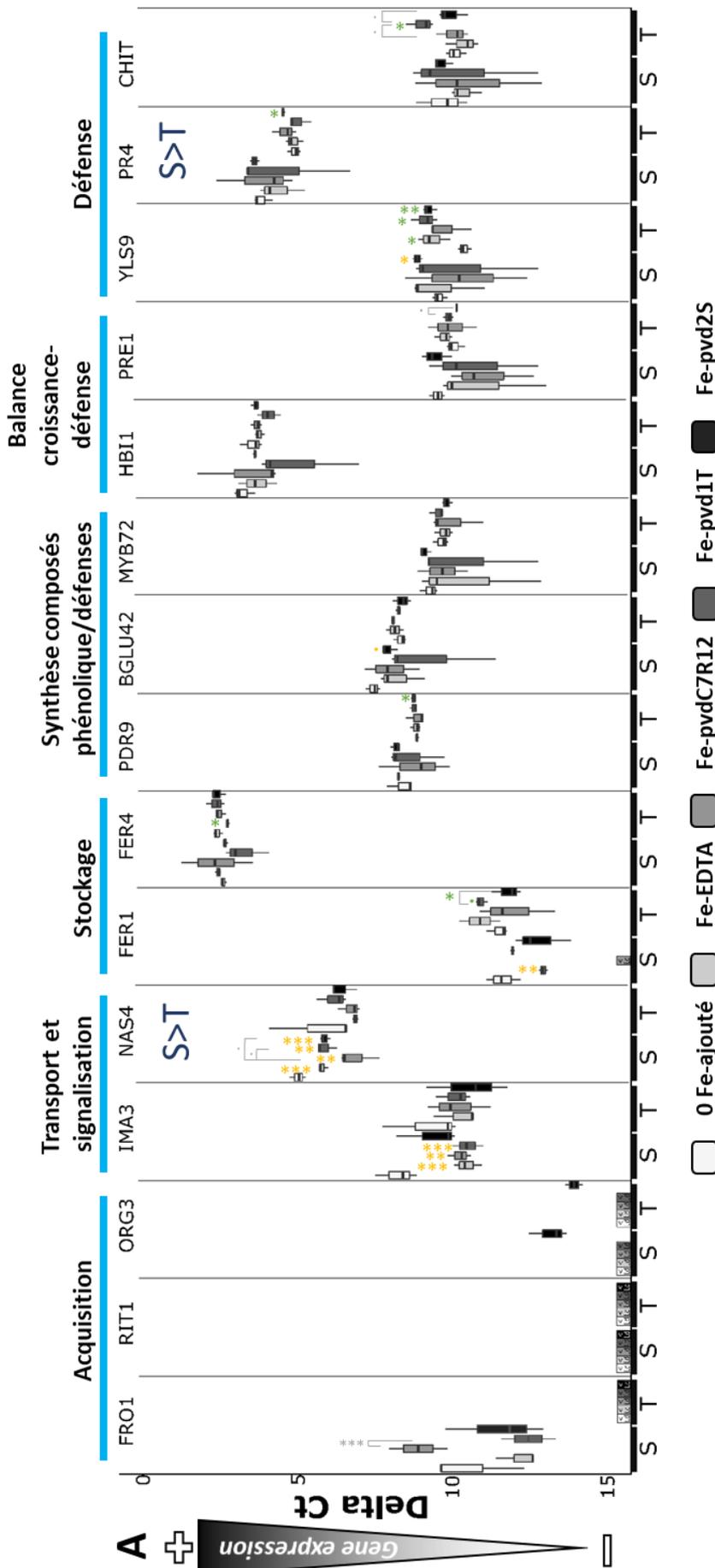


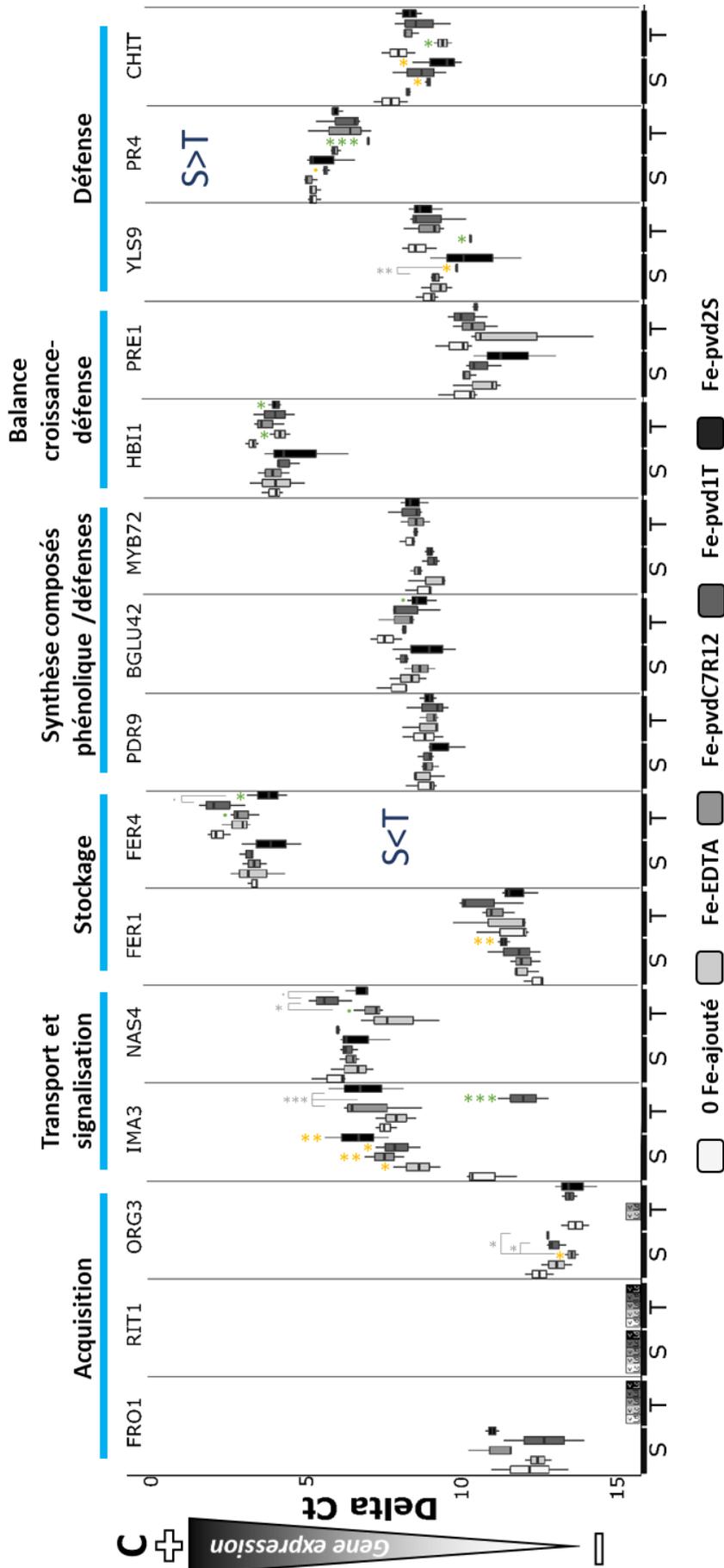
Figure 6. Expression de *CHIT*, *PR4* et *YLS9* chez les pois de deux cultivars, S, sensible et T, tolérant à la chlorose ferrique en réponse à différents apports en fer. Le fer a été apporté sous forme Fe-EDTA; Fe-pvdC7R12; Fe-pvd1T et Fe-pvd2S, ou n'a pas été apporté, 0 Fe-ajouté. Les données ont été obtenues par RT-PCR quantitative à partir d'échantillons récoltés 6h (T1), 12h (T2) et 24h (T3) après traitement. PA, partie aérienne. Delta Ct, Ct gène d'intérêt – (moyenne des Ct de 2 gènes de ménage). <Ld, valeurs de Ct sous le seuil de détection. Les différences significatives par rapport à la condition 0 Fe-ajouté ont été déterminées par un test t de Student. ; p <0,1, *; p<0,05; ** ,p<0,01; *** , p<0,001. Les niveaux de signification sont en jaune pour le pois S et en vert pour le pois T. Lorsque l'homoscédasticité n'était pas respectée, un test de Welch a été effectué. Les niveaux de signification sont en orange pour le pois S et en rouge pour le pois T.

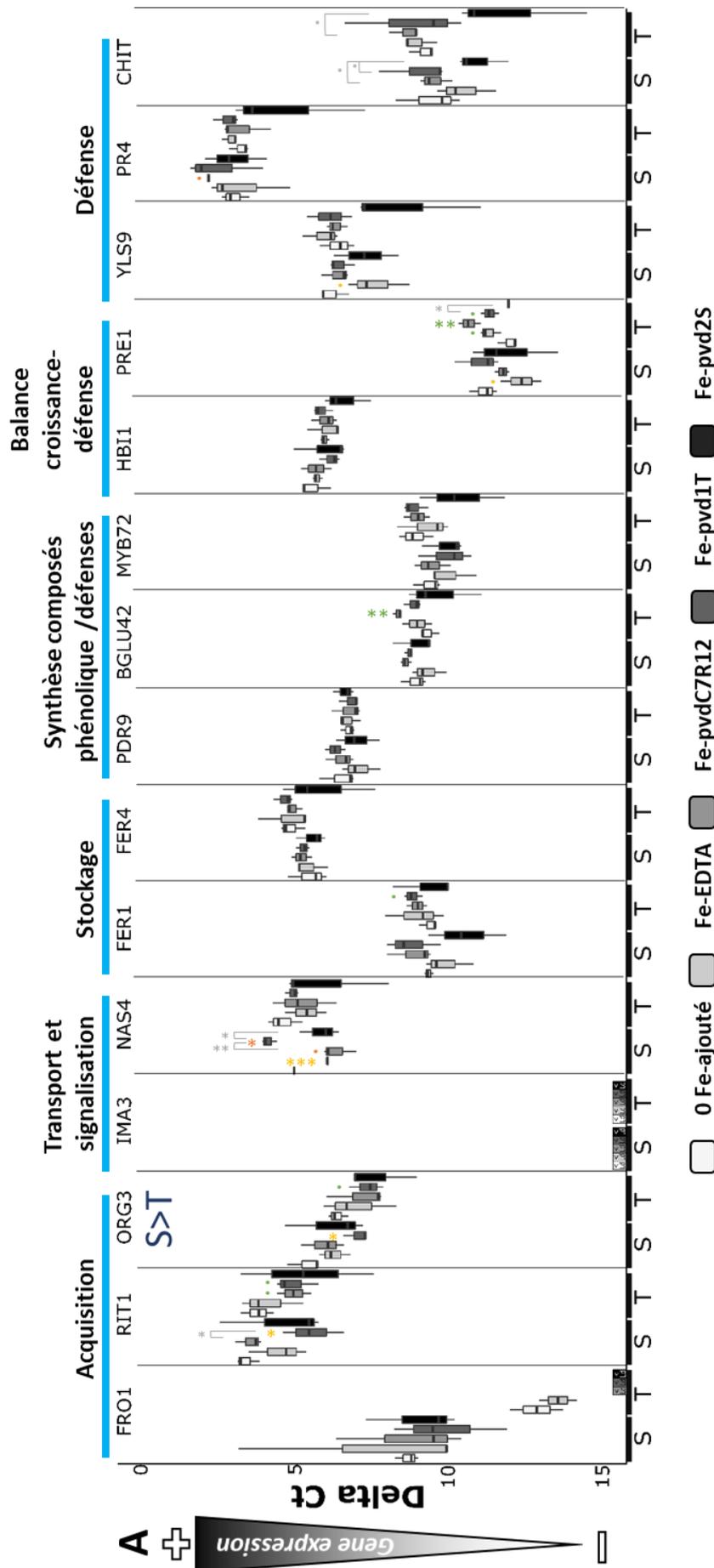
Dans les racines, les variations sont aussi fonction du cultivar de pois, du traitement et du temps (**Figure 6**). L'expression d'*YLS9* a été diminuée par les 3 ferripyoverdines 12 heures après apport chez le pois S. Pour T, on a observé une augmentation d'expression provoquée par Fe-pvdC7R12 après 48 heures. Peu de variations ont été observées pour *PR4*. En revanche, pour *CHIT*, un schéma de variation comparable à celui observé pour *YLS9* a été observé. L'expression a été diminuée par les 3 ferripyoverdines 12 heures après apport chez le pois S. Pour T, on a observé une augmentation d'expression provoquée par Fe-pvdC7R12 après 48 heures. En revanche, dans certains cas, une variabilité plus élevée des résultats n'a permis que d'observer des tendances.

L'expression de l'ensemble des gènes aux différents temps de la cinétique est présentée globalement (**Figure S1** pour les parties aériennes et **Figure S2** pour les parties racinaires).

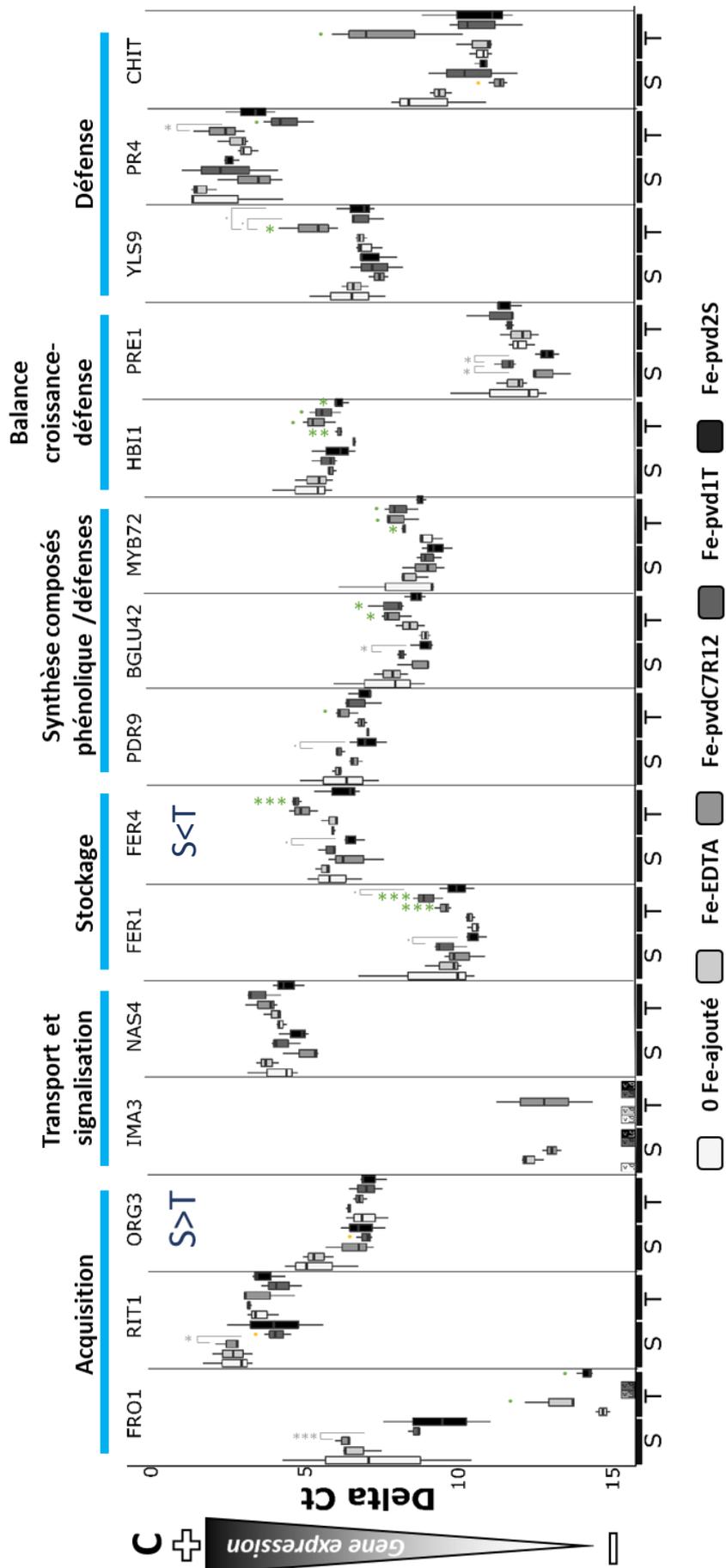


Figures S1. Expression globale des gènes dans les parties aériennes chez les pois de deux cultivars, S, sensible et T, tolérant à la chlorose ferrique en réponse à différents apports en fer. Le fer a été apporté sous forme Fe-EDTA; Fe-pvd1T et Fe-pvd2S, ou n'a pas été apporté, 0 Fe-ajouté. Les données ont été obtenues par RT-PCR quantitative à partir d'échantillons récoltés, **A**, 6h (T1), **B**, 12h (T2) et, **C**, 24h (T3) après traitement. Delta Ct, Ct gène d'intérêt – (moyenne des Ct de 2 gènes de ménage). <Ld, valeurs de Ct sous le seuil de détection. Les différences significatives par rapport à la condition 0 Fe-ajouté ont été déterminées par un test t de Student. ; p <0,1, *; p<0,05; ** p<0,01; *** p<0,001. Les niveaux de signification sont en jaune pour le pois S et en vert pour le pois T. Lorsque l'homocédasticité n'était pas respectée, un test de Welch a été effectué. Les niveaux de signification sont en orange pour le pois S et en rouge pour le pois T. S>T, Toutes conditions cumulées, l'expression du gène est significativement plus élevée pour le cultivar S que pour le cultivar T (ANOVA 2 paramètres, p<0,05) ; S<T, Toutes conditions cumulées, l'expression du gène est significativement plus élevée pour le cultivar T que pour le cultivar S (ANOVA 2 paramètres, p<0,05).





Figures S1. Expression globale des **gènes dans les racines** chez les pois de deux cultivars, S, sensible et T, tolérant à la chlorose ferrique en réponse à différents apports en fer. Le fer a été apporté sous forme Fe-EDTA; Fe-pvdC7R12; Fe-pvd1T et Fe-pvd2S, ou n'a pas été apporté, 0 Fe-ajouté. Les données ont été obtenues par RT-PCR quantitative à partir d'échantillons récoltés, **A**, 6h (T1), **B**, 12h (T2) et, **C**, 24h (T3) après traitement. Delta Ct, Ct gène d'intérêt – (moyenne des Ct de 2 gènes de ménage). ΔCt, valeurs de Ct sous le seuil de détection. Les différences significatives par rapport à la condition 0 Fe-ajouté ont été déterminées par un test t de Student. ; $p < 0,1$, * ; $p < 0,05$; ** , $p < 0,001$. Les niveaux de signification sont en jaune pour le pois S et en vert pour le pois T. Lorsque l'homoscédasticité n'était pas respectée, un test de Welch a été effectué. Les niveaux de signification sont en orange pour le pois S et en rouge pour le pois T. S>T, Toutes conditions cumulées, l'expression du gène est significativement plus élevée pour le cultivar S que pour le cultivar T (ANOVA 2 paramètres, $p < 0,05$) ; S<T, Toutes conditions cumulées, l'expression du gène est significativement plus élevée pour le cultivar S que pour le cultivar T (ANOVA 2 paramètres, $p < 0,05$).



3.2.6 Corrélations entre les expressions des gènes étudiés

L'analyse des corrélations d'expression des 16 gènes étudiés a été réalisée sur tous les temps de la cinétique confondus (6h, 12h et 24h) en utilisant le coefficient de Pearson (**Figure S3**).

Dans les racines du pois S, les expressions des gènes d'acquisition du fer *FRO1*, *RIT1* et *ORG3* sont corrélées (**Figure S3 A**). De la même manière les expressions des gènes de synthèse de composés phénoliques fluorescents *PDR9*, *BGLU42*, *MYB72*, d'*HBI1* impliqué dans la régulation croissance/défense, ainsi que celle des gènes de défense *YLS9*, *CHIT* et *PR4* sont corrélées entre elles. Dans les racines du pois T, l'analyse a mis en avant des corrélations dans les expressions, d'une part, des gènes d'acquisition du fer *RIT1* et *ORG3* et, d'autre part, des gènes *YLS9*, *BGLU42* et *PR4* (**Figure S3 B**).

Dans les parties aériennes, une même corrélation entre les expressions des gènes *HBI1* et *BGLU42* a été observée chez les deux cultivars de pois (**Figure S3 C et D**).

Figures S3.

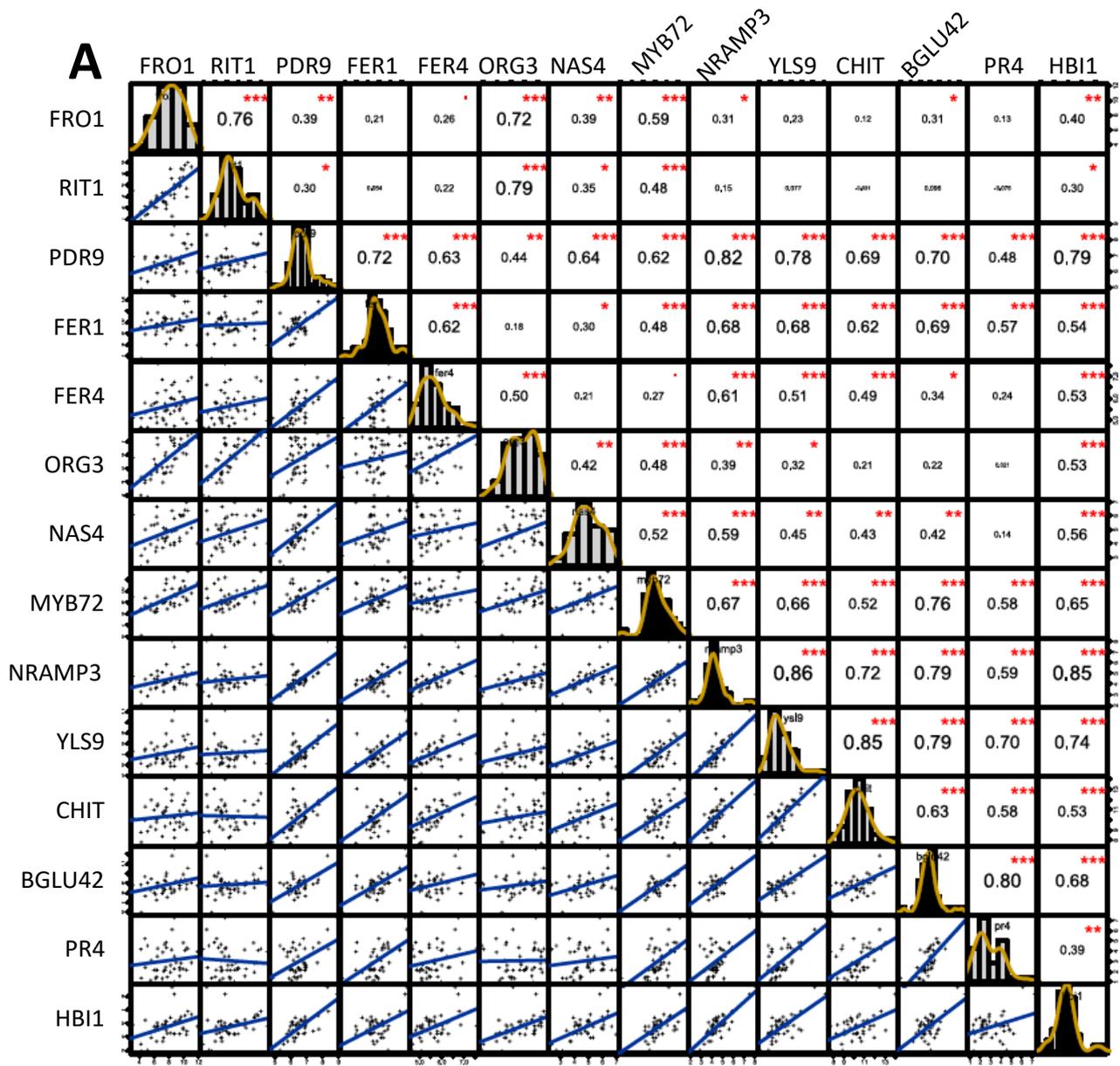
(A) Matrice de corrélation de l'expression des gènes étudiés, tous temps de cinétique confondus, dans les racines du pois S. *IMA3* et *PRE1* ne sont pas présentés; leur expression dans ce compartiment était trop faible pour permettre des analyses.

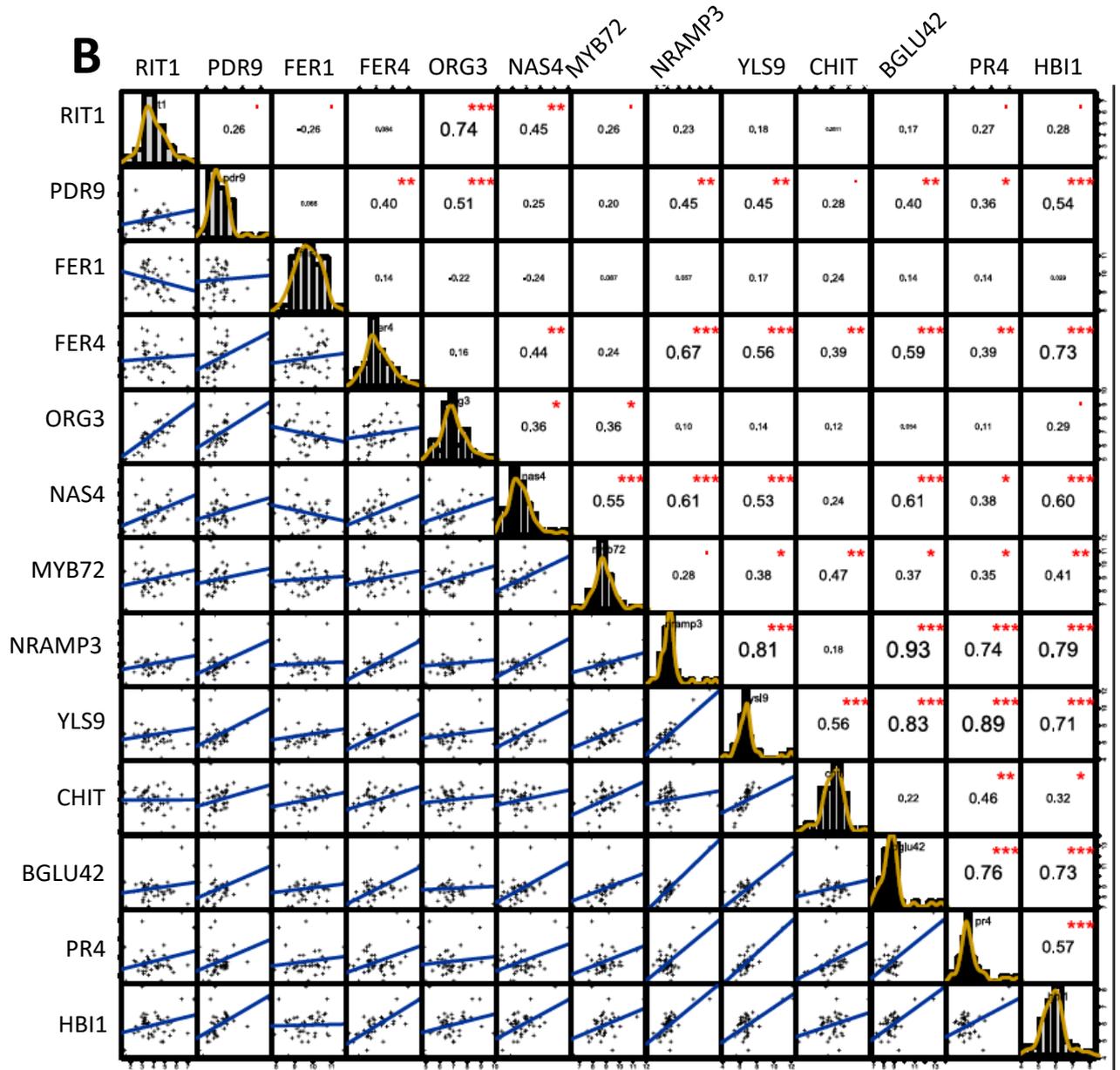
(B) Matrice de corrélation de l'expression des gènes étudiés, tous temps de cinétique confondus, dans les racines du pois T. *FRO2*, *IMA3* et *PRE1* ne sont pas présentés; leur expression dans ce compartiment était trop faible pour permettre des analyses.

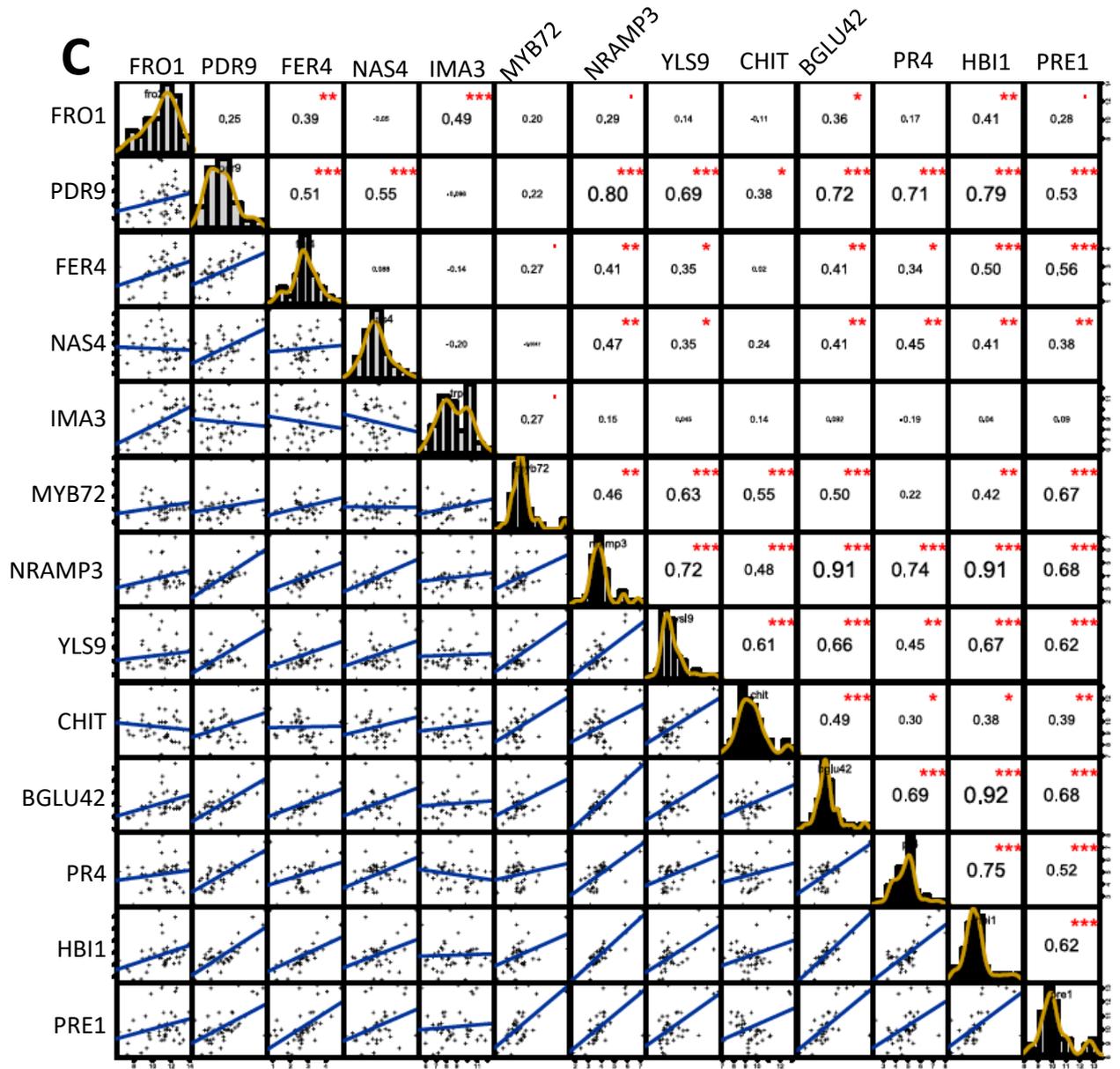
(C) Matrice de corrélation de l'expression des gènes étudiés, tous temps de cinétique confondus, dans les parties aériennes du pois S. *RIT1*, *FER1* et *ORG3* ne sont pas présentés; leur expression dans ce compartiment était trop faible pour permettre des analyses.

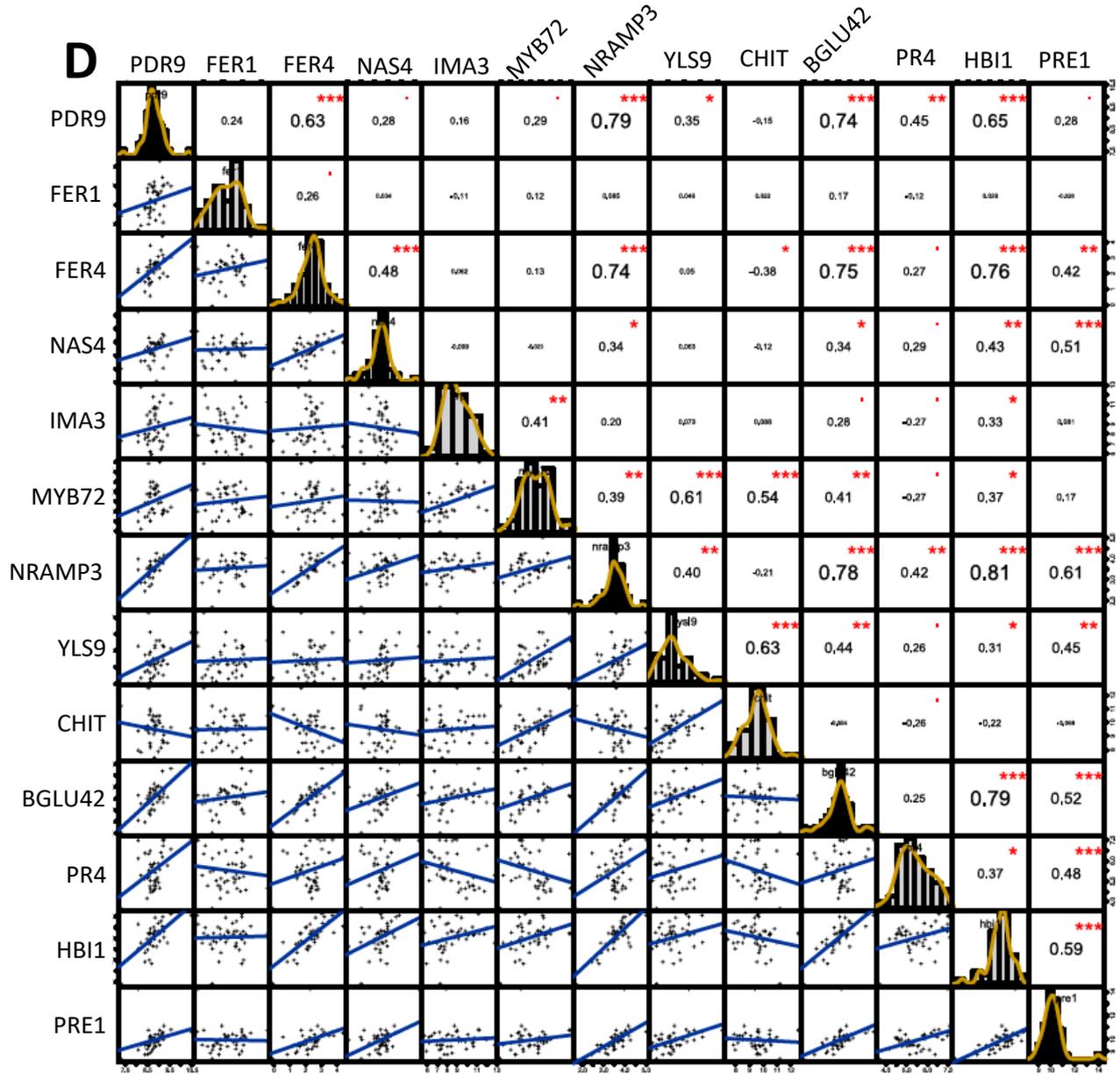
(D) Matrice de corrélation de l'expression des gènes étudiés, tous temps de cinétique confondus dans les parties aériennes du pois T. *FRO2*, *RIT1* et *ORG3* ne sont pas présentés; leur expression dans ce compartiment était trop faible pour permettre des analyses.

Les corrélogrammes ont été créés sur R avec la fonction `chart.Correlation` du package `PerformanceAnalytics`. La distribution des variables est montrée sur une diagonale. Les nombres présentés dans les carrés, situés au dessus de cette diagonale sont les coefficients de corrélations de Pearson. ., $p < 0,1$; *, $p < 0,05$; **, $p < 0,01$; ***, $p < 0,001$. Les dispersions et les régressions linéaires des variables correspondantes sont représentées respectivement par des nuages de points et des lignes bleues dans les carrés situés sous la diagonale.









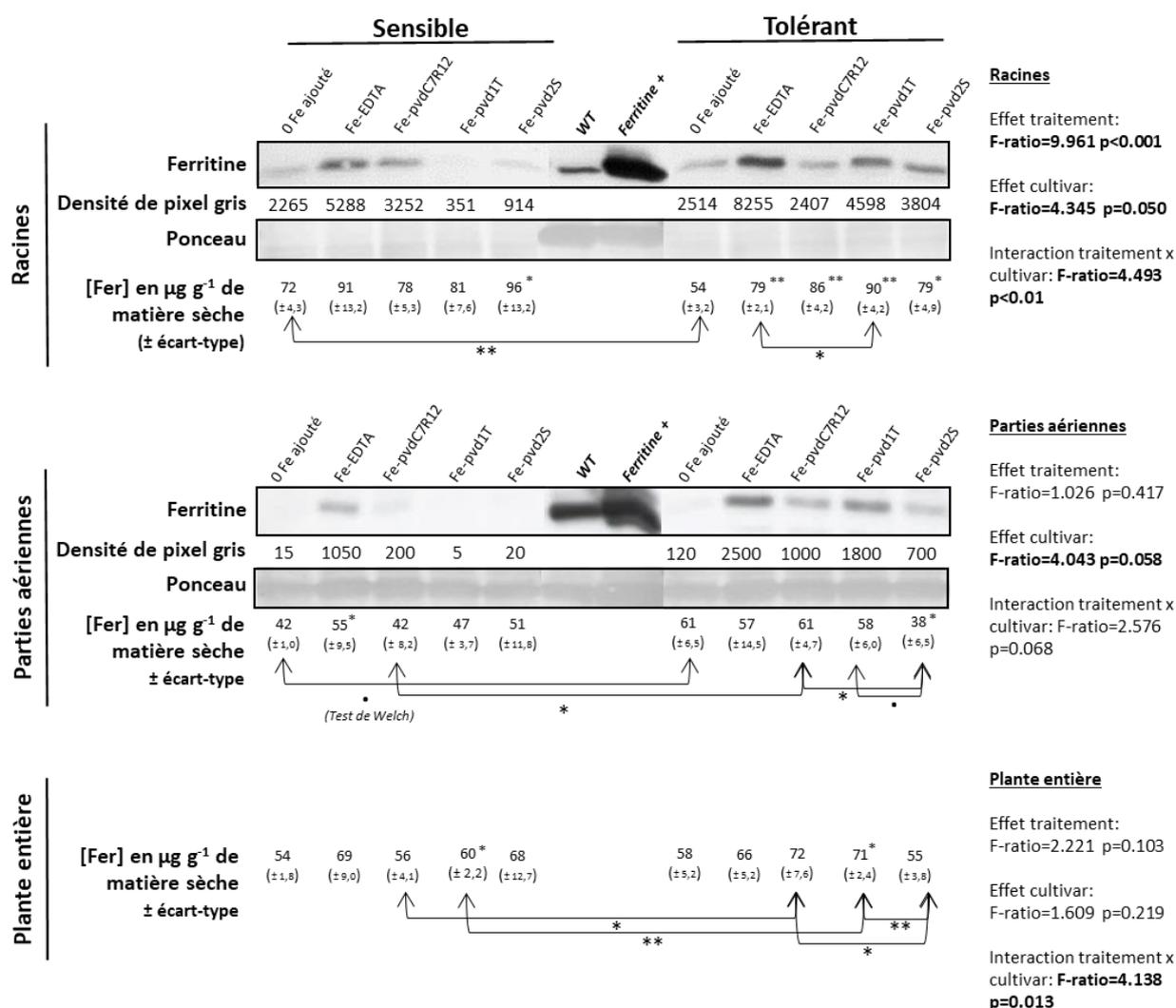


Figure 7. Western blots des ferritines présentes dans les racines et les parties aériennes de deux cultivars de pois, S, sensible et T, tolérant à la chlorose ferrique, 14 jours après supplémentation en fer (Fe-EDTA, 15 μM ; Fe-pvdC7R12, 15 μM ; Fe-pvd1T, 15 μM et Fe-pvd2S, 15 μM) ou non (0 Fe ajouté) et concentrations en fer des plantes correspondantes. WT et Ferritine +, correspondent respectivement au génotype sauvage col0 et à un mutant d'*A. thaliana* surexprimant la ferritine de soja (Vansuyt et al., 2007) utilisés comme témoins de migration des ferritines. Densité de pixels gris, évaluation des quantités de ferritines par une densité de pixels gris quantifiée via le logiciel de traitement d'image ImageJ (version V1.52k., <https://imagej.net>) pour permettre une comparaison semi-quantitative entre cultivars et traitements à l'intérieur d'un même compartiment. Ponceau, coloration des protéines au rouge Ponceau permettant de vérifier l'homogénéité de la quantité totale de protéines. Les valeurs entre parenthèses sont les écart-types des moyennes. Les concentrations en fer ont été comparées par une ANOVA suivie du test post-hoc de la plus petite différence significative (LSD) de Fisher. ; p<0,1; *, p<0,05; **, p<0,01. Les résultats des ANOVAS à deux paramètres sont présentés sur la droite de la figure. Les significations présentées en indice des valeurs moyennes indiquent une différence avec le témoin sans fer pour un même cultivar dans un même compartiment. Les significations indiquées sur les doubles flèches concernent la comparaison des traitements pointés.

3.3. **Abondance des ferritines et concentration en fer dans les plantes**

L'analyse des ferritines a été réalisée par Jordan Rossi, doctorant dirigé par Angélique Besson (pôle IPM, Interactions Plante-Microorganismes, de l'UMR Agroécologie) dans le cadre d'une collaboration. La quantité de ferritines présentes dans les plantes de 28 jours, 14 jours après les apports en fer, a été évaluée par immunotransfert (Western blotting). Les résultats ainsi que les concentrations en fer des plantes correspondantes sont présentés **Figure 7**.

Des différences dans les concentrations en fer des plantes des deux cultivars ayant ou non reçu des apports en fer sous quatre formes (Fe-EDTA, Fe-pvdC7R12, Fe-pvd1T, et Fe-pvd2S) ont été observées 14 jours après les traitements (**Figure 7**). A l'exception des parties aériennes des pois T traités avec Fe-pvd2S renfermant une concentration en fer significativement inférieure à celle des plantes non traitées, toutes les autres valeurs étaient non différentes significativement ou supérieures à celles des témoins non traités. Des augmentations significatives des concentrations en fer ont été observées dans les racines des pois T pour tous les apports de fer. La plus forte concentration, enregistrée après apport de Fe-pvd1T, était significativement supérieure à celle observée avec Fe-EDTA. Seule la Fe-pvd2S a produit une augmentation de la concentration en fer dans les racines du pois S. Une augmentation significative de la concentration en fer a également été observée dans les parties aériennes des pois S traitées avec Fe-EDTA. Globalement les concentrations en fer des parties aériennes des pois T étaient supérieures à celles des pois S. Un apport en fer sous forme Fe-pvd1T a permis d'augmenter significativement la concentration en fer des pois T par comparaison aux plantes témoins sans apport. Le traitement Fe-pvdC7R12 a également permis aux plantes de pois T d'atteindre en moyenne des concentrations en fer équivalentes à celles enregistrées après apport de Fe-pvd1T cependant, une forte variabilité a été observée. Pour le pois S, une augmentation significative de la quantité de fer des plantes entières a également été obtenue après apport de Fe-pvd1T. Toutefois, l'augmentation enregistrée par rapport au témoin était significativement plus faible que celle observée pour le pois T. Fe-pvd2S et Fe-EDTA ont aussi augmenté en moyenne la concentration en fer présente dans les pois T mais de façon très variable.

Les concentrations en ferritines observées étaient plus importantes pour les pois T que pour le pois S, dans les racines comme dans les parties aériennes, en accord avec l'effet

cultivar observé dans les parties aériennes pour les concentrations en fer des plantes (**Figure 7**). Dans les racines, une interaction significative entre cultivar et traitement a été observée sur les concentrations en fer. L'abondance des ferritines a mis en évidence un stockage du fer plus important dans les racines que dans les parties aériennes des plantes quel que soit le cultivar. Les concentrations en fer étaient également globalement plus importantes dans ce compartiment. Toutefois, pour les deux pois et dans les deux compartiments, les abondances les plus élevées de ferritines ont été observées après apport de Fe-EDTA alors que ce traitement n'a permis d'observer la concentration en fer la plus élevée que dans les parties aériennes du pois S. On peut notamment remarquer que dans les racines du pois T, la concentration en fer enregistrée après apport de Fe-pvd1T était significativement supérieure à celle de plantes supplémentées avec Fe-EDTA. Globalement, les quantités de ferritines et la concentration en fer des plantes ne sont pas corrélées. Les apports de fer avec les deux pvds produites par des *Pseudomonas* issus des pois (Fe-pvd1T et Fe-pvd2S) ont conduit aux plus faibles accumulations de ferritines pour le pois S. Pour ce pois, Fe-pvdC7R12 est la ferripyoverdine qui a conduit à l'accumulation la plus forte de ferritines. L'inverse a été observé dans les racines du pois T où c'est l'apport de Fe-pvd1T qui a conduit à la plus forte accumulation de ferritines. Cette ferripyoverdine a également conduit à la plus forte accumulation de ferritines dans les parties aériennes de ce pois.

4. Discussion

L'analyse en cinétique de l'expression de 16 gènes impliqués dans la régulation de l'acquisition et du statut en fer, de la balance croissance-défense et des réactions de défense des plantes après des apports en fer sous forme Fe-EDTA ou Fe-pvd pour 3 pvd distinctes a mis en évidence des différences entre (i) un cultivar de pois sensible (S) et un autre résistant à la chlorose ferrique (T), et (ii) entre les effets des différentes ferripyoverdines.

Des différences globales entre les deux cultivars de pois ont été observées dans les niveaux d'expression des gènes étudiés et dans les cinétiques de réponse de certains gènes aux apports en fer.

Des différences importantes entre les deux cultivars ont été mises en évidence pour les gènes impliqués dans l'acquisition du fer via la stratégie I, *ORG3*, *FRO1* et *RIT1*. Chez *Arabidopsis* il a été montré que l'expression des gènes correspondants était induite en conditions de carence en fer (Wang et al., 2007; Brumbarova et al., 2015; Naranjo-Arcos et al., 2017). L'ensemble des résultats obtenus pour les gènes impliqués dans l'acquisition du fer via la stratégie I **a mis en évidence dans les racines du pois S une réponse correspondant à celle décrite chez *Arabidopsis* comme la réponse d'une plante cultivée en situation de carence en fer.** De plus, pour ce cultivar, une expression de *FRO1* a été détectée dans les parties aériennes. Une étude antérieure a montré que chez le cultivar de pois Sparkle une expression de *FRO1* était détectée dans les parties aériennes en conditions de carence en fer (Waters, 2002). Ces travaux renforcent l'hypothèse selon laquelle le pois S se trouve en situation de carence dans nos conditions expérimentales. En revanche, l'expression de *FRO1*, totalement absente dans les parties aériennes et faible ou absente dans les racines, **n'indique pas que le pois T se trouve en situation de carence fer** ou indique, pour certains traitements, un manque de fer mais toujours moins important que pour le pois S. Or, les graines des deux cultivars pois contenaient des quantités de fer équivalentes (résultats non présentés) et les plantes ont été cultivées en présence des mêmes quantités de fer résiduelles. Ces résultats vont à l'encontre de l'hypothèse selon laquelle la tolérance à l'IDC serait liée à une capacité supérieure à induire une activité de la réductase ferrique mise en évidence par une augmentation de l'expression du gène *FRO1* pour le pois ou *FRO2* pour la vigne (Kabir et al., 2012; Vannozzi et al., 2017). En effet, cette hypothèse est liée à une perception plus sensible et rapide de la carence en fer

des génotypes tolérants à la chlorose ferrique. Dans nos conditions expérimentales qui incluent la présence d'une petite quantité de fer résiduel (*c.a.* 0,7 ppm) les observations faites suggèrent plutôt, à l'inverse, que **le cultivar T, tolérant à la chlorose ferrique perçoit de façon moins sensible la carence en fer. La tolérance au manque de fer du cultivar T indique qu'il pourrait présenter une plus grande efficacité à acquérir le fer et/ou avoir des besoins différents pour cet élément liés à une régulation différente *in planta*.**

La plus grande efficacité du cultivar de pois T à acquérir le fer a été confirmée dans nos conditions expérimentales pour deux des apports en fer (Fe-pvd 1T et Fe-pvdC7R12) (**Figure 7**). Il a été montré que les concentrations en fer des plantes entières du pois T étaient significativement supérieures à celles des pois S pour ces traitements. **Cette plus grande efficacité ne semble pas être associée à une augmentation du fonctionnement de la stratégie I d'acquisition du fer.** En effet, pour ces traitements, les différences observées entre les cultivars dans l'expression des gènes associés à l'acquisition du fer via la stratégie I, *ORG3*, *FRO1* et *RIT1*, indiquent une activité équivalente ou moins importante que celle du pois S. Chez le pois T, pour ces deux traitements mais aussi pour tous les autres, l'expression de *RIT1* dans les racines était importante et suggère une forte activité du transporteur membranaire de Fe²⁺ alors que le gène *FRO1*, codant la réductase ferrique, n'était pas ou très faiblement exprimé. L'absence de corrélation dans le fonctionnement de ces gènes, soulève l'hypothèse de l'existence d'une autre réductase ferrique ou d'une activité réductrice assurée d'une autre façon. Certains composés phénoliques fluorescents produits par la voie de synthèse des phénylpropanoïdes pourraient assurer cette activité réductrice et le fer rendu disponible pourrait être intégré via l'activité de *RIT1* comme montré chez *Arabidopsis* (Fourcroy et al., 2016; Tsai and Schmidt, 2017a). En accord avec cette hypothèse, une diminution de l'expression de *PDR9* a été observée dans les racines pour toutes les plantes du cultivar de pois S supplémentées en fer 12 heures après apport. La diminution de l'expression de ce gène codant le transporteur membranaire permettant l'excrétion par la racine de composés phénoliques fluorescents suggère une baisse de la capacité de réduction et d'acquisition du fer par cette voie chez le pois S. En revanche, aucune diminution de l'expression de *PDR9* n'a été observée pour le pois T conférant potentiellement à ce cultivar une activité réductrice et une acquisition du fer plus importante par cette voie. **La meilleure efficacité du cultivar T pour l'acquisition du fer pourrait donc être, au moins en partie, liée au système d'acquisition**

impliquant la synthèse de composés phénoliques. De plus, l'efficacité de la réduction et de l'acquisition du fer liées à la voie de synthèse des phénylpropanoïdes pourrait aussi varier avec le type de composés phénoliques produits (Tsai and Schmidt, 2017a). Il serait donc intéressant de comparer les composés phénoliques fluorescents produits par les deux pois. **Néanmoins, l'acquisition du fer entre les deux pois pourrait aussi différer pour un ou des systèmes d'acquisition du fer dont l'existence a été proposée par différents auteurs mais encore non décrits et dont le fonctionnement n'est rapporté par aucun des gènes étudiés** (Vansuyt et al., 2007; Jin et al., 2010; Tsai and Schmidt, 2017b).

La différence de régulation du statut du fer *in planta* entre les deux cultivars de pois est mise en évidence par des différences observées globalement dans l'expression des gènes étudiés, des différences dans les concentrations en fer et dans l'abondance des ferritines. Des différences entre les deux cultivars de pois ont été observées dans l'expression de gènes dont il a été montré chez *Arabidopsis* (et chez le pois pour *CHIT*) qu'ils interviennent dans la régulation croissance-défense et dans la défense de la plante (Fan et al., 2014; Malinovsky et al., 2014; Selim et al., 2017). L'expression de certains de ces gènes était de plus corrélée. Selon les cultivars et les conditions étudiées, des corrélations ont été observées entre l'expression des gènes *YLS9*, *CHIT*, *PR4*, et *HBI1*. De façon intéressante les corrélations observées entre l'expression d'*HBI1* et celle des gènes de défense étaient positives. Des corrélations ont aussi été observées entre l'expression des gènes de défense, *HBI1* et celle de *MYB72*, *BGLU42*, *PDR9*, qui sont à la fois impliqués dans la défense et dans l'acquisition du fer impliquant des composés phénoliques. Chez *Arabidopsis*, *HBI1* régule négativement un lot de gènes impliqués dans les défenses de la plante associés à la réponse aux MAMPs (Microbe-associated molecular pattern) privilégiant ainsi la croissance de la plante en liaison avec *IBH1* et *PRE1* (Fan et al., 2014; Malinovsky et al., 2014; Trapet et al., 2016). Toutefois d'autres gènes de défense sont aussi contrôlés positivement par ce gène chez *Arabidopsis* (Fan et al., 2014). Le système d'acquisition du fer impliquant *MYB72*, *BGLU42*, et *PDR9* est décrit comme particulièrement important dans l'apoplaste racinaire (Curie and Mari, 2017). Or, il a été montré récemment pour *Arabidopsis* qu'*HBI1* interviendrait sur la balance croissance-défense via la régulation de l'homéostasie des ROS dans l'apoplaste (Neuser et al., 2019). De plus, des corrélations ont aussi été observées entre l'expression d'*HBI1*, des gènes de défense et des gènes à la fois impliqués dans la défense et l'acquisition du fer et *FER4*, *ORG3*, et *NAS4*

impliqués dans l'homéostasie du fer. Compte tenu des interrelations importantes entre l'homéostasie du fer, les réponses de défense de la plante et l'homéostasie des ROS, il serait intéressant d'approfondir l'étude du rôle d'*HBI1* dans la régulation coordonnée de ces systèmes (Tripathi et al., 2018; Romera et al., 2019). En particulier il serait intéressant de retrouver chez le pois un orthologue d'*IHB1* ou un autre système associé au fonctionnement de *PRE1* dans la régulation potentielle d'*HBI1* (Malinovsky et al., 2014). L'absence de cet élément dans notre étude pourrait en effet expliquer l'absence de corrélation observée entre l'expression de *PRE1* et *HBI1* et avoir limité l'interprétation des résultats obtenus pour *PRE1*.

Des différences globales entre les deux cultivars ont aussi été enregistrées dans l'expression des gènes *FER1* et *FER4*. Dans les trois cas où un effet cultivar significatif a été observé (*FER1* dans les parties aériennes 12h après apport de fer, *FER4* dans les parties aériennes 12h après apport de fer et dans les racines 12h après apport de fer), le stockage du fer était plus important pour le pois T que pour le pois S. Ce résultat a été confirmé par les dosages des ferritines réalisés 14 jours après les études d'expression des gènes. L'expression des gènes *IMA3* et *NAS4* associés à la signalisation et au transport du fer entre racines et parties aériennes a également révélé des différences entre cultivars. L'expression de ces gènes a varié de façon plus importante pour le cultivar de pois S que pour le cultivar de pois T. En particulier dans les parties aériennes du pois S, une répression précoce de l'expression de ces 2 gènes a été enregistrée pour toutes les plantes supplémentées en fer 6 heures après les traitements. A l'inverse, une forte induction d'*IMA3* a été observée dans les parties aériennes de ce pois pour les plantes supplémentées en fer 24 heures après les traitements. Pour le pois T, aucune réponse globale aux apports en fer n'a été observée pour *IMA3* et *NAS4* dans ce compartiment. Dans les racines, de façon similaire, les seules variations d'expression de *NAS4* ont été observées pour le pois S. *NAS4* rapporte la synthèse de nicotianamine, principal chélateur et transporteur de Fe^{2+} intracellulaire (Curie et al., 2009). La répression de *NAS4* après les apports de fer pourrait indiquer une plus faible concentration en fer libre dans les pois S ayant reçu du fer sous forme de chélats que dans les plantes témoins ne disposant que de fer résiduel. *IMA3* a été décrit comme un peptide signal synthétisé dans les parties aériennes lorsque le fer manque dans ce compartiment (Grillet et al., 2018; Hirayama et al., 2018). La répression de l'expression de ce gène, peu après les apports en fer chez le pois S, pourrait indiquer que ce cultivar, qui répond à une carence en fer moins importante que le

pois T, répond aussi à des apports en fer moins importants. **Ces observations sont en faveur de l'hypothèse selon laquelle le cultivar tolérant à la chlorose ferrique pourrait avoir des besoins moins importants en fer grâce à une régulation différente de la physiologie de cet élément *in planta*.** En effet, Les réponses plus rapides et nombreuses du cultivar sensible aux variations des conditions environnementales pourraient être coûteuses en énergie et par conséquent en fer puisque ce microélément est essentiel dans le métabolisme des plantes.

Outre les différences observées globalement entre les deux cultivars de pois, les trois ferripyoverdines étudiées ont eu des effets différents sur les deux cultivars de pois.

Les effets les plus importants ont été observés pour la pvd synthétisée par un groupe de *Pseudomonas* dominant dans la rhizosphère du pois T résistant à la chlorose ferrique, Fe-pvd1T. L'apport de Fe-pvd1T a provoqué précocement (6 heures) une diminution de l'expression de d'*ORG3* et *RIT1*, et une augmentation de celle de *NAS4* dans les racines du pois S. Ces observations indiquent une présence de fer dans les racines plus importante que celle des autres traitements. La diminution de l'expression d'*ORG3* et de *RIT1* suggère une résorption de la carence en fer et l'augmentation de l'expression de *NAS4* rapporte des besoins de chélation par la nicotianamine du Fe²⁺ déjà internalisé. De façon intéressante, 6 heures plus tard (12 heures après apport de Fe-pvd1T) dans les racines, une diminution de l'expression de *FRO1* a été observée ainsi qu'une baisse globale de l'expression des gènes impliqués dans l'acquisition du fer via la synthèse de composés phénoliques (*MYB72*, *BGLU42* et *PDR9*). Plus particulièrement, l'expression de *MYB72* a été fortement diminuée pour le traitement Fe-pvd1T. Le même type d'effet pour deux gènes de défense, *YLS9* et *CHIT*, a aussi été noté. Toujours 12 heures après apport de Fe-pvd1T, dans les parties aériennes de ce pois (S), l'expression d'*ORG3* a été significativement diminuée par comparaison aux plantes témoins et l'expression de *FRO1* n'a plus été détectée indiquant également que les besoins en fer de ce compartiment pourraient avoir été satisfaits. Une forte répression de l'expression d'*IMA3* a de plus été observée dans les parties aériennes. Ceci est en accord avec le rôle de ce peptide signal synthétisé lors d'un manque de fer dans ce compartiment (Grillet et al., 2018; Hirayama et al., 2018). Pour le pois T, cette même forte diminution de l'expression d'*IMA3* suggérant un afflux de fer dans les parties aériennes a également été observée après apport de fer via Fe-pvd1T mais de façon plus tardive (24 heures après supplémentation). En revanche, pour ce pois, les diminutions antérieures et concomitantes de l'expression des

gènes d'acquisition du fer via la stratégie I (*ORG3*, *FRO1* et *RIT1*) et via la synthèse de composés phénoliques n'ont pas été observées. Au contraire, antérieurement à la baisse d'expression d'*IMA3* dans les parties aériennes, une augmentation de l'expression de *FER4* indiquant un stockage du fer a été observée. De façon concomitante à la baisse de l'expression d'*IMA3* dans les parties aériennes une augmentation importante de l'expression *FER1* et *FER4* a aussi été observée dans les racines. L'estimation des quantités de ferritines réalisée 14 jours après la fin de la cinétique confirme l'importance du stockage du fer sous cette forme après apport de Fe-pvd1T. C'est le traitement ferripyoverdine pour lequel la plus forte concentration de ferritines a été observée dans le pois T. Enfin Fe-pvd1T a aussi induit une augmentation de l'expression de *BGLU42* indiquant une possible augmentation de la synthèse de composés phénoliques. En résumé, l'analyse de l'expression des gènes étudiés suggère que Fe-pvd1T a induit un afflux de fer supérieur à ceux induits par les autres traitements pour les deux cultivars de pois. Ces résultats indiquent aussi que la gestion de cet afflux a différé selon le cultivar. Le pois S a répondu rapidement en diminuant l'expression des gènes liés à l'acquisition du fer alors qu'au contraire le pois T a répondu plus lentement, a stocké le fer et renforcé son acquisition notamment via la synthèse de composés phénoliques. Fe-pvd1T a effectivement conduit à l'observation des concentrations les plus importantes de fer dans les racines et, globalement dans la plante pour le pois T alors que les effets sur le pois S sont significativement plus faibles. **La ferripyoverdine Fe-pvd1T a donc été l'apport de fer le plus favorable à l'acquisition du fer pour le pois T et son effet a été significativement plus faible sur le pois S. Les différences mises en évidence entre les pois dans la gestion de l'apport en fer via Fe-pvd1T ont donc eu des conséquences différentes.**

Contrairement à Fe-pvd1T pour le pois S, la ferripyoverdine préparée avec la pyoverdine modèle pvdC7R12 a produit peu d'effets significativement différents de ceux enregistrés pour les plantes témoins ou ayant reçu d'autres apports en fer sur les gènes associés à l'acquisition du fer via la stratégie I (*ORG3*, *FRO1* et *RIT1*). De même, peu d'effets spécifiques ont été observés sur *NAS4*. Pour les autres gènes dont l'expression a été modifiée par Fe-pvd1T, Fe-pvdC7R12 a produit les mêmes effets que Fe-pvd1T mais avec une plus faible intensité. Ainsi l'expression des gènes *MYB72*, *YLS9* et *CHIT* a été diminuée dans les racines du pois S après 12 heures et celle des gènes *FER1*, *FER4*, et *BGLU42* a été augmentée dans les racines du pois T après 24 heures. Toutefois, bien que l'augmentation de l'expression des gènes codant les ferritines n'ait pas été observée pour le pois S, on peut noter qu'après le traitement Fe-EDTA,

l'apport de Fe-pvdC7R12 est le traitement pour lequel la plus forte concentration de ferritines a été observée. Ce décalage pourrait s'expliquer par un stockage par d'autres ferritines codées par des gènes qui n'ont pas été étudiés (Ravet et al., 2009). Le stockage du fer pourrait aussi avoir eu lieu entre le dernier point de la cinétique et l'analyse des plantes réalisée 13 jours après. Outre les réponses communes au traitement Fe-pvd1T, Fe-pvdC7R12 a provoqué de façon spécifique une augmentation de l'expression de *MYB72*, *BGLU42* et *YLS9* dans les parties aériennes du pois S après 12 heures et une augmentation de celle d'*YLS9* dans les racines du pois T après 24 heures. On a également pu noter des augmentations de l'expression de *PR4* et *CHIT* mais une forte variabilité des résultats ne permet que la description de tendances. Globalement, cette ferripyoverdine a donc influencé le stockage du fer et modifié l'expression de gènes de défense dont certains sont aussi impliqués dans l'acquisition du fer (*MYB72* et *BGLU42*) (Zamioudis et al., 2014). Ces observations faites après apport de Fe-pvdC7R12 pourraient être compatibles avec la mise en place par le pois T d'une stratégie de défense visant à séquestrer le fer pour le rendre indisponible à un pathogène. Cette stratégie, nommée immunité nutritionnelle ou hypoferrémie est bien connue chez les mammifères (Golonka et al., 2019). Des stratégies basées sur le même principe ont été rapportées chez les plantes (Lemanceau et al., 2009a; Verbon et al., 2017). L'augmentation de l'expression d'*YLS9* observée chez le pois T est en accord avec les résultats observés antérieurement sur *Arabidopsis* par Trapet (2015) après apport de pvdC7R12 et de fer. Dans l'étude précitée, l'expression d'*IMA3* (alors 'unknown protein') avait été fortement induite dans les racines d'*Arabidopsis* (Trapet, 2015). Cet effet a également été observé 24 heures après apport de Fe-pvdC7R12 dans les racines des deux pois. Les modifications de l'expression d'*IMA3* observées dans les parties aériennes des deux pois après apport de Fe-pvd1T étaient en accord le rôle de signal du peptide correspondant associé à un manque de fer dans ce compartiment (Grillet et al., 2018; Hirayama et al., 2018). Dans les racines du pois T traité avec Fe-pvdC7R12, l'expression d'*IMA3* a été concomitante à une augmentation de l'expression de *BGLU42* ce qui pourrait indiquer une augmentation de la synthèse des composés phénoliques permettant d'acquérir du fer. Cette réponse est cohérente avec le rôle de signal de carence en fer, activant les systèmes d'acquisition, proposé pour *IMA3*. En revanche, pour le pois S, si l'expression d'*IMA3* est comparable à celle observée pour le pois T, aucune régulation positive des systèmes d'acquisition du fer n'est indiquée par l'expression de *BGLU42* ou de *MYB72*. De même, on peut aussi remarquer pour le pois T qu'aucune induction des gènes de stratégie I n'est observée et que *FER1*, et dans une moindre mesure *FER4*, voient leur expression

augmenter et indiquer un probable stockage du fer. Ces observations interrogent sur le rôle du peptide codé par *IMA3* dans les racines. Pour le pois T, Fe-pvdC7R12 a conduit à observer une concentration en fer dans les racines significativement supérieure à celle du témoin sans fer ajouté. En revanche, aucun effet n'a été observé sur la concentration en fer du pois S après traitement avec cette ferripyoverdine. **Comme pour Fe-pvd1T, l'apport de fer sous forme Fe-pvdC7R12 a donc été profitable pour le pois T. En revanche, elle ne l'a pas été pour le pois S.**

Les effets les moins importants sur l'expression des gènes étudiés ont été observés pour la pvd synthétisée par un groupe de *Pseudomonas* dominant dans la rhizosphère du pois S sensible à la chlorose ferrique, Fe-pvd2S. Pour cette ferripyoverdine, la majorité des effets observés correspondait à des effets qui concernaient tous les apports en fer. Peu d'effets spécifiques significatifs ont été observés. Dans les parties aériennes, une augmentation faible de l'expression de *PDR9* et *PR4* a été observée après 6 heures pour le pois T. Après 24 heures, une augmentation de l'expression de *FER1* pour le pois S et une diminution de l'expression de *FER4* pour le pois T ont été enregistrées dans le même compartiment. Aucune modification significative de l'expression des gènes n'a été observée dans les racines pour cette ferripyoverdine. On peut néanmoins remarquer que pour le pois T, le niveau moyen d'expression le plus faible de 8 des 16 gènes étudiés (*FER1*, *FER4*, *BGLU42*, *MYB72*, *HBI1*, *YLS9*, *PR4* et *CHIT*), dont 6 des 8 gènes associés à la défense de la plante, a été enregistré 6 heures après apport de Fe-pvd2S. Malgré les faibles effets observés sur l'expression des gènes étudiés, l'apport de Fe-pvd2S a modifié le statut en fer des plantes. La concentration en fer des racines du pois T a été augmentée comme pour les deux autres ferripyoverdines. En revanche, celle des parties aériennes a été significativement diminuée de telle sorte qu'aucun effet bénéfique global n'a été observé au niveau de la plante entière. Pour le pois S, Fe-pvd2S a eu des effets bénéfiques sur la quantité de fer moyenne accumulée par les racines, les parties aériennes et donc la plante entière. Toutefois, la très forte variabilité de ces effets ne permet que de rendre compte d'une tendance. Pour ce pois (S), le même type de tendance a été observé après apport de Fe-EDTA. **Une tendance favorable à l'accumulation du fer dans les plantes de pois S a été observée après apport de la ferripyoverdine Fe-pvd2S. Cette même tendance a été observée pour Fe-EDTA. Pour le pois T, les modifications observées n'ont pas eu d'impact global sur la concentration en fer dans la plante.**

En conclusion, l'interaction entre chaque ferripyoverdine et chaque cultivar de pois a produit des effets spécifiques. Les effets bénéfiques les plus marqués sur la nutrition en fer des pois ont été observés après un apport en fer sous la forme Fe-pvd1T au cultivar de pois T, tolérant à la chlorose ferrique. Pour ce pois, des effets bénéfiques ont aussi été observés après apport d'une autre ferripyoverdine, Fe-pvdC7R12. L'expression des gènes *FER1*, *FER4*, et *BGLU42* a été modifiée de façon similaire dans les racines du pois T après 24 heures par ces deux pvds. Ces gènes pourraient être considérés comme des marqueurs potentiels d'une interaction bénéfique entre une ferripyoverdine et une plante de pois. Leur intérêt en tant que marqueurs devra être validé dans des études impliquant d'autres cultivars de pois pour lesquels des effets bénéfiques d'un apport en ferripyoverdine peuvent être observés. En effet, Fe-pvd1T et Fe-pvdC7R12 n'ont pas produit d'effet bénéfique sur la nutrition en fer du pois S. On peut donc s'interroger plus généralement sur la capacité d'un cultivar de pois sensible à la chlorose ferrique à acquérir le fer à partir de ces deux ferripyoverdines dont l'une, Fe-pvdC7R12, a déjà également produit des effets favorables à la nutrition en fer sur d'autres plantes que le pois comme *Arabidopsis* et des graminées pérennes (Avoscan et al., en révision pour JXB; Trapet, 2015; Trapet et al., 2016; Shirley et al., 2011; Vansuyt et al., 2007). Cette incapacité pourrait en effet contribuer à la sensibilité à la chlorose ferrique d'une plante. De façon intéressante, le bio-essai développé pour l'étude des plantes *in vitro* a permis de placer le pois sensible à la chlorose ferrique, et pas le pois tolérant, dans des conditions de carence en fer. Certains gènes étudiés ont ainsi été identifiés comme des marqueurs potentiels de la sensibilité. En particulier le gène *FRO1*, dont l'expression était très faible ou nulle dans les racines et totalement nulle dans les parties aériennes du pois tolérant T, pourrait être un marqueur intéressant pour détecter la sensibilité d'une plante à l'IDC. Des travaux antérieurs ont déjà rapporté des résultats contradictoires sur l'expression de *FRO1* ou l'activité ferrique réductase dans les parties aériennes de plantes et renforcent l'intérêt de l'étude de ce marqueur potentiel (Schmidt, 1999; Waters, 2002). Une nouvelle étude portant sur les pois S et T et cinq autres cultivars de pois est actuellement en cours pour étudier évaluer la validité des marqueurs potentiels de l'effet bénéfique de pvds sur la nutrition en fer et de la sensibilité de pois à l'IDC. De même, l'hypothèse de l'incapacité d'un pois sensible à utiliser une ferripyoverdine favorable à la nutrition en fer sera évaluée ainsi que les observations intéressantes faites sur certains gènes tels qu'*IMA3* et *HBI1*.

5. Références

- Alves-Carvalho, S., Aubert, G., Carrère, S., Cruaud, C., Brochot, A.-L., Jacquin, F., et al. (2015). Full-length *de novo* assembly of RNA-seq data in pea (*Pisum sativum* L.) provides a gene expression atlas and gives insights into root nodulation in this species. *Plant J* 84, 1–19. doi:10.1111/tpj.12967.
- Banerjee, S., Walder, F., Büchi, L., Meyer, M., Held, A. Y., Gattinger, A., et al. (2019). Agricultural intensification reduces microbial network complexity and the abundance of keystone taxa in roots. *Int Soc Microbial Ecol J* 13, 1722–1736. doi:10.1038/s41396-019-0383-2.
- Brumbarova, T., Bauer, P., and Ivanov, R. (2015). Molecular mechanisms governing *Arabidopsis* iron uptake. *Trends Plant Sci.* 20, 124–133. doi:10.1016/j.tplants.2014.11.004.
- Budzikiewicz, H. (2004). Siderophores of the Pseudomonadaceae sensu stricto (fluorescent and non-fluorescent *Pseudomonas* spp.). *Fortschr Chem Org Naturst* 87, 81–237. doi:doi.org/10.1007/978-3-7091-0581-8_2.
- Cézar, C., Farvacques, N., and Sonnet, P. (2015). Chemistry and biology of pyoverdines, *Pseudomonas* primary siderophores. *Current medicinal chemistry* 22, 165–186. doi:10.2174/0929867321666141011194624.
- Cohen, C. K., Garvin, D. F., and Kochian, L. V. (2004). Kinetic properties of a micronutrient transporter from *Pisum sativum* indicate a primary function in Fe uptake from the soil. *Planta* 218, 784–792. doi:10.1007/s00425-003-1156-7.
- Compant, S., Samad, A., Faist, H., and Sessitsch, A. (2019). A review on the plant microbiome: ecology, functions, and emerging trends in microbial application. *J. Adv. Res* 19, 29–37. doi:10.1016/j.jare.2019.03.004.
- Curie, C., and Briat, J.-F. (2003). Iron transport and signaling in plants. *Annu Rev Plant Biol* 54, 183–206. doi:10.1146/annurev.arplant.54.031902.135018.
- Curie, C., Cassin, G., Couch, D., Divol, F., Higuchi, K., Le Jean, M., et al. (2009). Metal movement within the plant: contribution of nicotianamine and yellow stripe 1-like transporters. *Ann Bot* 103, 1–11. doi:10.1093/aob/mcn207.
- Curie, C., and Mari, S. (2017). New routes for plant iron mining. *New Phytol* 214, 521–525. doi:10.1111/nph.14364.
- Fan, M., Bai, M.-Y., Kim, J.-G., Wang, T., Oh, E., Chen, L., et al. (2014). The bHLH transcription factor HBI1 mediates the trade-off between growth and pathogen-associated molecular pattern-triggered immunity in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 26, 828–841. doi:10.1105/tpc.113.121111.
- Fourcroy, P., Sisó-Terraza, P., Sudre, D., Savirón, M., Rey, G., Gaymard, F., et al. (2014). Involvement of the ABCG37 transporter in secretion of scopoletin and derivatives by *Arabidopsis* roots in response to iron deficiency. *New Phytol* 201, 155–167. doi:10.1111/nph.12471.
- Fourcroy, P., Tissot, N., Gaymard, F., Briat, J.-F., and Dubos, C. (2016). Facilitated Fe nutrition by phenolic compounds excreted by the *Arabidopsis* ABCG37/PDR9 transporter requires the IRT1/FRO2 high-affinity root Fe²⁺ transport system. *Molecular Plant* 9, 485–488. doi: 10.1016/j.molp.2015.09.010.
- Golonka, R., Yeoh, B. S., and Vijay-Kumar, M. (2019). The iron tug-of-war between bacterial siderophores and innate immunity. *J Innate Immun* 11, 249–262. doi:10.1159/000494627.
- Grillet, L., Lan, P., Li, W., Mokkalapati, G., and Schmidt, W. (2018). IRON MAN is a ubiquitous family of peptides that control iron transport in plants. *Nature Plants* 4, 953. doi:10.1038/s41477-018-0266-y.

- Grillet, L., and Schmidt, W. (2019). Iron acquisition strategies in land plants: not so different after all. *New Phytol*, nph.16005. doi:10.1111/nph.16005.
- Hacquard, S., Garrido-Oter, R., González, A., Spaepen, S., Ackermann, G., Lebeis, S., et al. (2015). Microbiota and host nutrition across plant and animal kingdoms. *Cell Host Microbe* 17, 603–616. doi:10.1016/j.chom.2015.04.009.
- Hartney, S. L., Mazurier, S., Girard, M. K., Mehnaz, S., Davis, E. W., Gross, H., et al. (2013). Ferric-pyoverdine recognition by Fpv outer membrane proteins of *Pseudomonas protegens* Pf-5. *J. Bacteriol.* 195, 765–776. doi:10.1128/JB.01639-12.
- Hider, R. C., and Kong, X. (2010). Chemistry and biology of siderophores. *Nat. Prod. Rep.* 27, 637. doi:10.1039/b906679a.
- Hirayama, T., Lei, G. J., Yamaji, N., Nakagawa, N., and Ma, J. F. (2018). The putative peptide gene FEP1 regulates iron deficiency response in *Arabidopsis*. *Plant Cell Physiol* 59, 1739–1752. doi:10.1093/pcp/pcy145.
- Ishimaru, Y., Suzuki, M., Tsukamoto, T., Suzuki, K., Nakazono, M., Kobayashi, T., et al. (2006). Rice plants take up iron as an Fe³⁺-phytosiderophore and as Fe²⁺. *Plant J* 45, 335–346. doi:10.1111/j.1365-313X.2005.02624.x.
- Jin, C. W., Li, G. X., Yu, X. H., and Zheng, S. J. (2010). Plant Fe status affects the composition of siderophore-secreting microbes in the rhizosphere. *Ann Bot* 105, 835–841. doi:10.1093/aob/mcq071.
- Kabir, A. H., Paltridge, N. G., Able, A. J., Paull, J. G., and Stangoulis, J. C. R. (2012). Natural variation for Fe-efficiency is associated with upregulation of Strategy I mechanisms and enhanced citrate and ethylene synthesis in *Pisum sativum* L. *Planta* 235, 1409–1419. doi:10.1007/s00425-011-1583-9.
- Kobayashi, T., and Nishizawa, N. K. (2012). Iron uptake, translocation, and regulation in higher plants. *Annu Rev Plant Biol.* 63, 131–152. doi:10.1146/annurev-arplant-042811-105522.
- Kreplak, J., Madoui, M.-A., Cápál, P., Novák, P., Labadie, K., Aubert, G., et al. (2019). A reference genome for pea provides insight into legume genome evolution. *Nat Genet* 51, 1411–1422. doi:10.1038/s41588-019-0480-1.
- Lanquar, V., Lelièvre, F., Bolte, S., Hamès, C., Alcon, C., Neumann, D., et al. (2005). Mobilization of vacuolar iron by AtNRAMP3 and AtNRAMP4 is essential for seed germination on low iron. *The EMBO Journal* 24, 4041–4051. doi:10.1038/sj.emboj.7600864.
- Lemanceau, P., Expert, D., Gaymard, F., Bakker, P. A. H. M., and Briat, J.-F. (2009a). “Role of iron in plant–microbe interactions,” in *Advances in Botanical Research Advances in Botanical Research*. (Academic Press), 491–549. doi:10.1016/S0065-2296(09)51012-9.
- Lemanceau, P., Bauer, P., Kraemer, S., and Briat, J.-F. (2009b). Iron dynamics in the rhizosphere as a case study for analyzing interactions between soils, plants and microbes. *Plant Soil* 321, 513–535. doi:10.1007/s11104-009-0039-5.
- Levy, A., Salas Gonzalez, I., Mittelviehhaus, M., Clingenpeel, S., Herrera Paredes, S., Miao, J., et al. (2018). Genomic features of bacterial adaptation to plants. *Nat Genet* 50, 138–150. doi:10.1038/s41588-017-0012-9.
- Malinovsky, F. G., Batoux, M., Schwessinger, B., Youn, J. H., Stransfeld, L., Win, J., et al. (2014). Antagonistic regulation of growth and immunity by the *Arabidopsis* basic helix-loop-helix transcription factor. *Plant Physiol.* 164, 1443–1455. doi:10.1104/pp.113.234625.

- Meyer, J. M., and Abdallah, M. A. (1978). The fluorescent pigment of *Pseudomonas fluorescens*: biosynthesis, purification and physicochemical properties. *Microbiology* 107, 319–328. doi:doi.org/10.1099/00221287-107-2-319.
- Meyer, J.-M., Gruffaz, C., Raharinosy, V., Bezverbnaya, I., Schäfer, M., and Budzikiewicz, H. (2008). Siderotyping of fluorescent *Pseudomonas*: molecular mass determination by mass spectrometry as a powerful pyoverdine siderotyping method. *Biometals* 21, 259–271. doi:10.1007/s10534-007-9115-6.
- Naranjo-Arcos, M. A., Maurer, F., Meiser, J., Pateyron, S., Fink-Straube, C., and Bauer, P. (2017). Dissection of iron signalling and iron accumulation by overexpression of subgroup Ib bHLH039 protein. *Sci Rep* 7, 10911. doi:10.1038/s41598-017-11171-7.
- Neuser, J., Metzen, C. C., Dreyer, B. H., Feulner, C., van Dongen, J. T., Schmidt, R. R., et al. (2019). HBI1 mediates the trade-off between growth and Immunity through Its impact on apoplasmic ROS homeostasis. *Cell Reports* 28, 1670-1678.e3. doi:10.1016/j.celrep.2019.07.029.
- Palmer, C. M., Hindt, M. N., Schmidt, H., Clemens, S., and Guerinot, M. L. (2013). MYB10 and MYB72 are required for growth under iron-limiting conditions. *PLoS Genet.* 9, e1003953. doi:10.1371/journal.pgen.1003953.
- Ravet, K., Touraine, B., Boucherez, J., Briat, J.-F., Gaynard, F., and Cellier, F. (2009). Ferritins control interaction between iron homeostasis and oxidative stress in Arabidopsis. *Plant J* 57, 400–412. doi:10.1111/j.1365-313X.2008.03698.x.
- Robin, A., Mazurier, S., Mougél, C., Vansuyt, G., Corberand, T., Meyer, J.-M., et al. (2007). Diversity of root-associated fluorescent pseudomonads as affected by ferritin overexpression in tobacco: diversity of fluorescent pseudomonads in rhizosphere. *Environ. Microbiol.* 9, 1724–1737. doi:10.1111/j.1462-2920.2007.01290.x.
- Robin, A., Mougél, C., Siblot, S., Vansuyt, G., Mazurier, S., and Lemanceau, P. (2006). Effect of ferritin overexpression in tobacco on the structure of bacterial and pseudomonad communities associated with the roots: Structure of rhizosphere bacterial and pseudomonad communities. *FEMS Microbiol Ecol* 58, 492–502. doi:10.1111/j.1574-6941.2006.00174.x.
- Robin, A., Vansuyt, G., Hinsinger, P., Meyer, J. M., Briat, J. F., and Lemanceau, P. (2008). "Chapter 4 Iron dynamics in the rhizosphere," in *Advances in Agronomy* (Elsevier), 183–225. Available at: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0065211308004045>.
- Romera, F. J., García, M. J., Lucena, C., Martínez-Medina, A., Aparicio, M. A., Ramos, J., et al. (2019). Induced systemic resistance (ISR) and Fe deficiency responses in dicot plants. *Front Plant Sci* 10, 287. doi:10.3389/fpls.2019.00287.
- Schmid, N. B., Giehl, R. F. H., Döll, S., Mock, H.-P., Strehmel, N., Scheel, D., et al. (2014). Feruloyl-CoA 6'-Hydroxylase1-dependent coumarins mediate iron acquisition from alkaline substrates in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* 164, 160–172. doi:10.1104/pp.113.228544.
- Schmidt, H., Günther, C., Weber, M., Spörlein, C., Loscher, S., Böttcher, C., et al. (2014). Metabolome analysis of *Arabidopsis thaliana* roots identifies a key ketabolic pathway for iron acquisition. *PLoS ONE* 9, e102444. doi:10.1371/journal.pone.0102444.
- Schmidt, W. (1999). Mechanisms and regulation of reduction-based iron uptake in plants. *The New Phytologist* 141, 1–26.
- Selim, S., Sanssené, J., Rossard, S., and Courtois, J. (2017). Systemic induction of the defensin and phytoalexin pisatin pathways in pea (*Pisum sativum*) against *Aphanomyces euteiches* by acetylated and nonacetylated oligogalacturonides. *Molecules* 22, 1017. doi:10.3390/molecules22061017.

- Shirley, M., Avoscan, L., Bernaud, E., Vansuyt, G., and Lemanceau, P. (2011). Comparison of iron acquisition from Fe-pyoverdine by strategy I and strategy II plants. *Botany* 89, 731–735. doi:10.1139/b11-054.
- Trapet, P. (2015). Incidence physiologique et étude du mode d'action de la pyoverdine de *Pseudomonas fluorescens* chez *Arabidopsis thaliana* : liens avec l'homéostasie du fer, la croissance et les défenses.
- Trapet, P., Avoscan, L., Klinguer, A., Pateyron, S., Citerne, S., Chervin, C., et al. (2016). The *Pseudomonas fluorescens* siderophore pyoverdine weakens *Arabidopsis thaliana* defense in favor of growth in iron-deficient conditions. *Plant Physiol.* 171, 675–693. doi:10.1104/pp.15.01537.
- Tripathi, D. K., Singh, S., Gaur, S., Singh, S., Yadav, V., Liu, S., et al. (2018). Acquisition and homeostasis of iron in higher plants and their probable role in abiotic stress tolerance. *Front. Environ. Sci.* 5, 86 doi:10.3389/fenvs.2017.00086.
- Tsai, H. H., and Schmidt, W. (2017a). Mobilization of iron by plant-borne coumarins. *Trends Plant Sci.* 22, 538–548. doi:10.1016/j.tplants.2017.03.008.
- Tsai, H.-H., and Schmidt, W. (2017b). One way. Or another? Iron uptake in plants. *New Phytol* 214, 500–505. doi:10.1111/nph.14477.
- van Loon, L. C., Bakker, P. A., van der Heijdt, W. H., Wendehenne, D., and Pugin, A. (2008). Early responses of tobacco suspension cells to rhizobacterial elicitors of induced systemic resistance. *MPMI* 21, 1609–1621. doi:doi.org/10.1094/MPMI-21-12-1609.
- van Loon, L. C., Rep, M., and Pieterse, C. M. J. (2006). Significance of inducible defense-related proteins in infected plants. *Annu Rev Phytopathol* 44, 135–162. doi:10.1146/annurev.phyto.44.070505.143425.
- Vannozzi, A., Donnini, S., Vigani, G., Corso, M., Valle, G., Vitulo, N., et al. (2017). Transcriptional characterization of a widely-used grapevine rootstock genotype under different iron-limited conditions. *Front. Plant Sci.* 7, 1994. doi:10.3389/fpls.2016.01994.
- Vansuyt, G., Robin, A., Briat, J.-F., Curie, C., and Lemanceau, P. (2007). Iron acquisition from Fe-pyoverdine by *Arabidopsis thaliana*. *MPMI* 20, 441–447. doi:doi.org/10.1094/MPMI-20-4-0441.
- Verbon, E. H., Trapet, P. L., Stringlis, I. A., and Kruijs, S. (2017). Iron and immunity. *Annu Rev Phytopathol*, 355–75. doi:10.1146/annurev-phyto-080516-035537.
- Wang, H.-Y., Klatter, M., Jakoby, M., Bäumlein, H., Weisshaar, B., and Bauer, P. (2007). Iron deficiency-mediated stress regulation of four subgroup Ib BHLH genes in *Arabidopsis thaliana*. *Planta* 226, 897–908. doi:10.1007/s00425-007-0535-x.
- Waters, B. M. (2002). Characterization of FRO1, a pea ferric-chelate reductase involved in root iron acquisition. *Plant Physiol.* 129, 85–94. doi:10.1104/pp.010829.
- Xiong, H., Kakei, Y., Kobayashi, T., Guo, X., Nakazono, M., Takahashi, H., et al. (2013). Molecular evidence for phytosiderophore-induced improvement of iron nutrition of peanut intercropped with maize in calcareous soil. *Plant Cell Environ* 36, 1888–1902. doi:10.1111/pce.12097.
- Yuan, Y., Wu, H., Wang, N., Li, J., Zhao, W., Du, J., et al. (2008). FIT interacts with AtbHLH38 and AtbHLH39 in regulating iron uptake gene expression for iron homeostasis in *Arabidopsis*. *Cell Res* 18, 385–397. doi:10.1038/cr.2008.26.
- Zamioudis, C., Hanson, J., and Pieterse, C. M. J. (2014). β -Glucosidase BGLU42 is a MYB72-dependent key regulator of rhizobacteria-induced systemic resistance and modulates iron deficiency responses in *Arabidopsis* roots. *New Phytol* 204, 368–379. doi:10.1111/nph.12980.

Bilan

Comme recherché, cette étude a fourni des informations permettant de mieux comprendre comment les deux cultivars de pois S et T utilisent les différents ferrisidérophores et les effets produits par l'utilisation de ces chélats bactériens. Les effets spécifiques des pvds sur le statut en fer des deux cultivars de pois correspondaient à des effets également spécifiques sur l'expression des gènes étudiés. Néanmoins, il a été possible d'identifier des profils communs dans l'expression de certains gènes en rapport avec des effets bénéfiques d'un apport en fer sous forme ferripyoverdine. Des marqueurs potentiels d'interactions favorables entre plante et sidérophores bactériens ont donc pu être identifiés et devront être validés. Ce travail a également permis de dégager de nouvelles hypothèses concernant l'origine de la tolérance d'un génotype à la chlorose ferrique et souligné l'intérêt du dispositif expérimental développé. En effet les conditions expérimentales utilisées ont placé le pois sensible, et pas le pois tolérant, à la chlorose dans des conditions de carence en fer, et des marqueurs potentiels permettant de caractériser facilement cet état ont été identifiés.

Conclusions générales et perspectives

Les études s'intéressant à la nutrition en fer des plantes ne prennent généralement pas, ou peu, en compte le rôle des microorganismes. Un travail bibliographique (**Chapitre I**) a permis de montrer qu'ils sont pourtant essentiels en illustrant leur rôle dans les différentes stratégies utilisées ou envisagées pour la biofortification en fer des plantes. De manière générale, quelle que soit la stratégie choisie pour promouvoir la nutrition en fer des plantes (fertilisation, amélioration végétale, adaptation de systèmes de culture,...), les microorganismes ont un impact direct ou indirect. Il apparaît donc que la prise en compte de leur activité ouvre de nouvelles perspectives d'amélioration. Grâce aux progrès importants réalisés dans l'étude des interactions plante-microorganismes, le rôle déterminant du génotype des plantes dans le recrutement de leur microbiote est maintenant connu. De plus, une influence réciproque des microorganismes sur la plante et de la plante sur les microorganismes en relation avec la dynamique du fer dans la rhizosphère a été suggérée par différentes études dans lesquelles l'importance particulière des *Pseudomonas* spp. fluorescents et de leurs sidérophores principaux, les pvds, a également été soulignée.

Dans ce contexte, nous nous sommes interrogés sur l'importance des interactions liées à la dynamique du fer dans la rhizosphère entre la plante et les microorganismes du sol dans la tolérance à la chlorose ferrique. En effet chez le pois, légumineuse à graines à fort potentiel en agroécologie, cette caractéristique est cultivar dépendante et sa variabilité gêne le développement des cultures dans les sols calcaires. Cette étude a été menée sur la base d'un schéma conceptuel de boucle de rétroaction pour prendre en compte les interactions réciproques entre la plante et les microorganismes. Dans un premier temps, nous avons étudié l'impact du génotype végétal sur le recrutement des microorganismes de la rhizosphère. Puis dans un second temps nous avons étudié, en retour, l'effet des microorganismes recrutés sur la plante. Ce travail a été réalisé avec deux cultivars de pois, l'un sensible (S) et l'autre tolérant (T) à la chlorose ferrique (IDC). L'étude de l'effet des deux cultivars de pois a porté sur les communautés de *Pseudomonas* et sur les communautés bactériennes totales (**Chapitre II**). La diversité a été étudiée sur la base de marqueurs taxonomiques et fonctionnels en relation avec la diversité des sidérophores. L'étude, en retour, de l'effet des microorganismes sur la plante a été réalisée à trois niveaux (i) au niveau de l'organisme, en étudiant l'impact de

ferripyoverdines issues de souches associées aux deux pois et d'une Fe-pvd modèle (Fe-pvdC7R12) sur la croissance et la teneur en fer et en autres éléments de la plante (**Chapitre III**), (ii) au niveau cellulaire, en étudiant la localisation et les effets *in planta* de la ferripyoverdine modèle, Fe-pvdC7R12, sur une plante modèle, *A. thaliana* (**Chapitre IV**) et (iii) au niveau moléculaire, en étudiant l'impact des 3 mêmes ferripyoverdines sur l'expression des gènes de la plante (**Chapitre V**).

1. Développement d'outils

La réalisation de ce projet a nécessité, d'une part, le développement d'outils moléculaires permettant d'étudier la diversité des *Pseudomonas* spp. fluorescents, et de leurs pvds, et d'autre part, la mise au point d'un dispositif de culture du pois *in vitro* permettant d'étudier l'impact des pvds et des bactéries sur les plantes dans des conditions contrôlées.

La recherche de marqueurs moléculaires permettant d'étudier la diversité des *Pseudomonas* et des pvds était nécessaire pour deux raisons: (i) nous souhaitons associer des approches d'étude directe de communautés fonctionnelles, à partir d'ADN extrait, aux études de souches cultivables isolées et (ii) même pour des souches cultivables isolées, les méthodes disponibles pour caractériser les pvds sont lourdes et/ou coûteuses (Focalisation isoélectrique ou Isoelectrofocusing, IEF; HPLC-MS...) et limitent leur application aux études de diversité. L'objectif était donc de développer des outils moléculaires permettant la caractérisation de la diversité (i) infragénérique des *Pseudomonas*, et (ii) structurale des sidérophores des *Pseudomonas* spp. fluorescents. Pour cela le polymorphisme de séquences partielles de trois gènes (*gacA*, *pvdQ* et *pvdA*) au sein d'une collection comportant de nombreuses souches de référence appartenant au genre *Pseudomonas* a été étudié et comparé à la diversité des pvds correspondantes évaluée par IEF (**Chapitre II**). Les résultats ont montré que la séquence partielle de *gacA* permet de caractériser la diversité infragénérique des *Pseudomonas*. Bien que les résultats, encore en cours d'analyse, n'aient pas pu être inclus dans ce document, cette séquence a également pu être amplifiée directement à partir d'ADN extrait de sols et de racines. De plus, une correspondance a été observée entre le polymorphisme des séquences *gacA* et celui des pvds produites par les souches des *Pseudomonas* spp. fluorescents. Les souches présentant des séquences identiques ou très proches produisent des pvds semblables. La séquence partielle de *gacA* permet donc d'étudier la diversité infragénérique

des *Pseudomonas* mais également d'étudier la diversité des pvds des *Pseudomonas* spp. fluorescents. Toutefois, concernant les pvds, le résultat de l'étude est conditionné par les références disponibles. Il apparaît donc important de continuer à caractériser les pvds encore non identifiées des souches isolées. Il serait également intéressant d'utiliser la spectrométrie de masse pour caractériser les différentes pvds identifiées par IEF mais dont la structure n'a pas été décrite. Pour les *Pseudomonas* spp. fluorescents, les mêmes regroupements de souches ont été réalisés sur la base des séquences partielles des gènes *gacA* et *pvdQ*. Néanmoins, le polymorphisme de la séquence *pvdQ* est plus important que celui de *gacA* et permet d'envisager de dessiner des amorces spécifiques permettant l'étude de groupes de souches produisant des sidérophores particuliers par qPCR ou RT qPCR.

Le travail réalisé sur une collection de souches de référence pour développer ces outils moléculaires a en outre permis de faire des observations soutenant l'hypothèse d'une variabilité dans la fonction des pvds et celle d'un rôle potentiel de transferts horizontaux dans l'évolution des gènes de synthèse des pvds.

Un dispositif permettant de cultiver des pois *in vitro* dans des conditions contrôlées a été développé, puis utilisé pour étudier : (i) l'impact de souches inoculées sur la croissance et la teneur élémentaire des pois (**Chapitre III**) et sur la gravité de la pourriture racinaire induite par *A. euteiches* (**Chapitre II**) et (ii) l'impact de pvds sur la croissance et la teneur élémentaire des pois (**Chapitre III**) et sur l'expression de certains gènes des pois (**Chapitre V**). Deux inconvénients principaux ont été rencontrés ; le temps de culture des plantes, de 4 semaines, n'a pas permis d'étudier la formation de graines et la culture individuelle en tube de chaque plante a engendré une variabilité importante des résultats en dépit du nombre conséquent de plantes analysées par traitement (6 à 9) et de la préparation d'échantillons composites (plantes groupées par deux ou trois). Néanmoins, le dispositif a permis la réalisation de l'étude et, de plus, d'envisager le développement de tests de sensibilité à *A. euteiches* et à la chlorose ferrique pour les cultivars de pois. En effet, en prenant en compte la mortalité des plantes en présence d'*A. euteiches*, les résultats obtenus ont mis en évidence une différence de sensibilité à la maladie des deux cultivars étudiés (**Chapitre II**). Il serait intéressant de confirmer ces résultats avec un nombre plus important de plantes par traitement et avec d'autres cultivars de pois sensibles ou non à l'agent pathogène afin d'évaluer l'intérêt du pathotest. De même, l'étude de l'expression des gènes des deux cultivars de pois suggère que

dans les conditions de culture utilisées, le pois IDC sensible se trouve en conditions de carence en fer alors que le pois IDC tolérant ne l'est pas (**Chapitre V**). La durée du bioessai (4 semaines) n'a pas permis de visualiser des symptômes typiques de chlorose (jaunissement des feuilles autour des nervures) même si une tendance a été observée (résultats non présentés). Afin de pouvoir observer l'apparition de ces symptômes, il serait intéressant d'allonger la durée du test en utilisant des tubes plus gros et avec plus de milieu nutritif. L'étude de l'expression de gènes marqueurs de la carence en fer semble aussi être un bon moyen pour détecter l'IDC chez les plantes. En effet *FRO1* était fortement exprimé dans les feuilles du pois sensible carencé alors qu'aucune expression n'a été détectée dans les feuilles du pois tolérant. Comme pour le pathotest, ces résultats sont à valider avec d'autres cultivars de pois dont on connaît la tolérance ou la sensibilité à l'IDC

2. Effets de la plante sur les microorganismes

Nos résultats ont montré que deux cultivars de pois présentant une sensibilité différente à la chlorose ferrique avaient un impact différent sur les microorganismes du sol. Ces résultats corroborent des travaux réalisés sur d'autres espèces végétales montrant que le recrutement du microbiote rhizosphérique est génotype dépendant (Compant *et al.*, 2019).

Dans notre étude, des différences ont été mises en évidence au niveau des communautés bactériennes totales (**Chapitre II**). Elles concernent les Oxalobacteraceae (plus représentées chez le pois S) et les Xanthomonadaceae (plus représentées chez le pois T). Il serait intéressant d'approfondir ces résultats qui concernent des familles bactériennes caractéristiques de la rhizosphère. En effet, le marqueur utilisé (ARNr16S) est taxonomique et ne permet pas d'identifier de variations à l'intérieur de ces familles. Ce marqueur n'a pas détecté de différences dans la représentation des Pseudomonadaceae qui comprend les *Pseudomonas*. Il serait intéressant d'utiliser le marqueur *gacA* en PCR quantitative, plus adapté pour rechercher une différence dans la représentation globale des *Pseudomonas* pour les deux pois. De même l'analyse des séquences *gacA* amplifiées directement à partir d'ADN de la rhizosphère devrait nous permettre de décrire la diversité globale des *Pseudomonas* et de la comparer à celle décrite sur les souches isolées.

Les résultats obtenus sur les *Pseudomonas* spp. fluorescents isolés de la rhizosphère des pois S et T ont mis en évidence l'importance de l'utilisation de marqueurs spécifiques des groupes bactériens à étudier et de l'étude des caractéristiques fonctionnelles. En effet, aucune différence significative n'a été observée lorsque la distribution dans les groupes taxonomiques des bactéries recrutées par les deux cultivars de pois a été comparée (**Chapitre II**). En revanche des différences ont été observées lorsque la diversité fonctionnelle des bactéries, en relation avec le fer, a été étudiée. Ainsi, lorsque les *Pseudomonas* ont été regroupés sur la base des types de pvds produites, une différence a été observée. Les pvds majoritairement produites par les isolats du pois T (pvd1T) et du pois S (pvd2S) différaient (**Chapitre II**). De plus, des pvds identiques peuvent être produites par des bactéries possédant des fonds génomiques différents. Les outils moléculaires de caractérisation des *Pseudomonas* développés peuvent donc être utilisés afin de déterminer si les pois T et S cultivés dans des sols différents vont recruter les mêmes types de *Pseudomonas* et/ou de pvds et ainsi tester l'hypothèse du recrutement d'un core microbiote fonctionnel (Lemanceau et al., 2017b). L'analyse des isolats recrutés par les deux pois dans trois sols différents est actuellement en cours. Par ailleurs, nous avons observé que les souches isolées du pois IDC tolérant, T, présentaient globalement une plus grande aptitude à résister à une carence en fer, mise en évidence par des CMI de 8HQ globalement plus élevées (**Chapitre II**). La même observation a été faite antérieurement dans une étude comparant les CMI de 8HQ de *Pseudomonas* associés à la rhizosphère d'un tabac transgénique surexpresser de ferritine suraccumulant le fer à celle du tabac sauvage (Robin *et al.*, 2007). Nous pouvons donc émettre l'hypothèse que le pois IDC tolérant, T, accumulerait plus de fer que le pois IDC sensible, S, créant ainsi un puits de fer plus important dans la rhizosphère conduisant à la sélection des microorganismes les plus aptes à résister à cette diminution de la disponibilité en fer. Cette hypothèse est supportée par les résultats obtenus dans l'étude de l'effet des Fe-pvds sur la nutrition en fer des pois (**Chapitre III**) et dans celle de l'expression de gènes impliqués dans l'acquisition et dans le stockage du fer chez les deux cultivars de pois (**Chapitre V**). En effet il a été montré que pour certains apports en fer, les concentrations en fer du pois T étaient supérieures à celles du pois S. Ces observations ont été faites lorsque l'apport de fer a été réalisé sous la forme de deux des 3 ferripyoverdines étudiées, Fe-pvdC7R12 et Fe-pvd1T. Pour ces traitements, nous avons également pu observer une expression importante des ferritines (*FER1* et *FER4*) quelques heures après les apports en fer correspondants. A l'instar de ce qui a pu être observé pour le tabac surexpresser de

ferritine par Robin *et al.* (2007), la Fe-pvd1T, pvd la plus synthétisée par les *Pseudomonas* isolés de la rhizosphère du pois T, a pu contribuer à la création d'un puits de fer plus important par une meilleure acquisition du fer et par la stimulation de la synthèse des ferritines de la plante. Cette plus grande efficacité d'acquisition du fer du pois T pourrait être associée à des différences entre les deux pois dans les systèmes d'acquisition du fer. Différents résultats sont en accord avec cette hypothèse. Chez le pois S, l'expression des gènes est concordante avec une acquisition faisant intervenir, au moins en partie, les gènes liés à la stratégie I. Chez le pois T en revanche, Fe-pvd1T a conduit à une induction de la synthèse des ferritines et, *in fine*, à une accumulation de fer significativement supérieure au témoin sans que les différences d'expression des gènes impliqués dans l'acquisition du fer étudiés (stratégie I ou synthèse de composés phénoliques) n'aient permis d'expliquer cette différence. L'acquisition de ferripyoverdine via un système non réductif putatif, encore non décrit et dont le fonctionnement n'est rapporté par aucun des gènes étudiés, est compatible avec ces observations. L'hypothèse de l'existence d'un tel système est renforcée par les résultats présentés **chapitre IV**. Dans cette étude, il a été montré que l'acquisition de Fe-pvd est associée à la formation de vésicules suggérant l'implication d'un mécanisme de type endocytose. Cependant, d'autres études seront nécessaires pour décrire ce mécanisme et identifier les gènes impliqués. De plus, il serait intéressant de savoir si, comme chez *Arabidopsis*, des vésicules en présence de Fe-pvd peuvent être observées chez le pois et si des différences existent entre les pois S et T et selon les pvds. La nature des composés phénoliques produits par les plantes peut impacter fortement la structure des communautés bactériennes (Jin *et al.*, 2010; Stringlis *et al.*, 2018). Nous avons également observé des différences selon les pois et les pvds dans la modulation des gènes impliqués dans leur synthèse (*MYB72/BGLU42/PDR9*). Il paraît donc important de compléter la comparaison de l'effet des deux pois sur les microorganismes par la comparaison de la nature de ces composés.

3. Effets des microorganismes sur la plante

Les principales pvds produites par les *Pseudomonas* isolés de la rhizosphère des deux pois présentaient toutes une activité antagoniste liée à la compétition pour le fer à l'encontre d'*Aphanomyces euteiches*, oomycète phytopathogène provoquant de la pourriture racinaire chez le pois (**Chapitre II**). Des différences d'intensité ont été observées dans l'antagonisme

selon les pvds mais aucun lien n'a été observé avec le pois d'origine. Globalement, les *Pseudomonas* de la rhizosphère des deux pois pourraient être capables de limiter la croissance saprophyte du pathogène via la compétition pour le fer dans le sol étudié. L'activité antagoniste de souches associées à la rhizosphère des deux pois dans un sol pour lequel des problèmes d'infection par *A. euteiches* sont régulièrement rapportés devra être étudiée afin de déterminer si une aptitude globale à l'antagonisme est aussi observée. Dans le cas contraire, les souches originaires du sol calcaire et alcalin étudié pourraient constituer, dans ce sol, un premier niveau de protection contre la maladie qu'il serait alors intéressant d'approfondir.

Les sept isolats, représentatifs de la diversité décrite dans la rhizosphère des deux pois, ont en majorité montré une aptitude à protéger ces plantes contre la pourriture racinaire. En effet, une diminution de la mortalité de plantules cultivées *in vitro* a été mise en évidence (**Chapitre II**). Selon les souches et les cultivars de pois concernés des différences dans la protection ont également pu être observées. Il n'a pas été observé de corrélation entre l'aptitude à l'antagonisme des pvds et le niveau de protection assuré par les souches correspondantes. Cette situation peut s'expliquer par le fait que beaucoup de mécanismes autres que la limitation de la croissance saprophyte du pathogène via la compétition pour le fer due à la synthèse de sidérophores peuvent être impliqués dans cette protection lorsque les souches sont présentes. En plus de leur sidérophore principal, la pvd, les *Pseudomonas* spp. fluorescents synthétisent d'autres sidérophores et en particulier des sidérophores dits secondaires tels que la pyochéline ou l'ornicorrugatine (Cornelis, 2010). Ces bactéries peuvent aussi synthétiser d'autres molécules à effet antibiotique et sont capables d'induire les systèmes de défense de la plante provoquant une résistance systémique (ISR). Néanmoins, nos résultats montrent que globalement, les *Pseudomonas* de la rhizosphère des pois ont une aptitude à protéger les plantes contre la maladie étudiée. Comme pour l'aptitude à l'antagonisme, il serait intéressant de comparer la protection assurée par ces isolats à celle de bactéries associées à la rhizosphère des deux pois dans un sol pour lequel des problèmes d'infection par *A. euteiches* sont régulièrement rapportés. Comme pour l'antagonisme, aucune relation n'a été observée entre la protection contre la maladie et le pois d'origine des isolats. Nous pouvons remarquer que deux des isolats étudiés ont assuré un bon niveau de protection sur les deux cultivars de pois (D4214 appartenant au groupe taxonomique des

P. koreensis (ko-a3) et B2216 appartenant au groupe taxonomique des *P. koreensis* (ko-a4) et pourraient être étudiés pour leur effets comme agents de biocontrôle.

Les pvds majoritairement produites par les isolats du pois T (pvd1T) et du pois S (pvd2S) ont eu des effets importants et différents sur la nutrition en fer des plantes. L'étude présentée **Chapitre III** a permis de montrer (i) que des pvds différentes peuvent avoir des effets différents sur le statut en fer des plantes, et (ii) que ces effets varient aussi avec le génotype des plantes. Il a été observé que la ferripyoverdine qui a été la plus favorable à la nutrition en fer pour chaque cultivar de pois était celle produite majoritairement par les isolats issus de sa propre rhizosphère. Néanmoins, il a aussi été observé que les Fe-pvds étaient globalement plus favorables à la nutrition en fer du pois IDC tolérant qu'à celle du pois IDC sensible S. Les Fe-pvds ont eu des effets sur les concentrations en fer mais aussi sur les concentrations d'autres éléments nutritifs essentiels. Un autre effet important observé et également variable selon les pvds et les cultivars de pois a été l'impact sur la répartition du fer entre les racines et les parties aériennes. Les pvds ont eu des effets sur cette répartition, considérée comme étant un élément clé de la résistance à la chlorose ferrique, pour le pois T IDC tolérant. L'étude de l'expression d'une série de gènes clés dans l'acquisition et l'homéostasie du fer et dans les réactions de défense de la plante a permis d'associer les effets des Fe-pvds sur le statut en fer des plantes à des réponses spécifiques (**Chapitre V**). Nous avons notamment observé que les Fe-pvds favorables à la nutrition en fer du pois T (Fe-pvd1T et la ferripyoverdine modèle Fe-pvdC7R12) avaient induit dans les racines une augmentation concomitante de l'expression de certains gènes suggérant à la fois l'augmentation du stockage du fer (*FER1*, *FER4*), l'augmentation de l'acquisition du fer via la synthèse de composés phénoliques (*MYB72*, *BGLU42*), et plus hypothétiquement, l'orientation de la balance croissance/défense vers la croissance (*HBI1*). Actuellement la validité de ces marqueurs potentiels des interactions favorables à la nutrition en fer entre pois et Fe-pvd est en cours d'étude sur d'autres cultivars de pois. Des variations très importantes de l'expression du gène *IMA3* ont aussi été observées et conduit à nous interroger sur le rôle de ce peptide en relation avec les apports en fer sous forme Fe-pvd (Grillet et al., 2018; Hirayama et al., 2018). Des essais sont actuellement en cours avec des mutants *IMA3* d'*Arabidopsis* pour tenter de mieux comprendre les observations faites. Il serait également intéressant d'élargir l'étude aux autres peptides appartenant à la famille IMA.

4. Conclusion

Les études présentées montrent que les *Pseudomonas* spp. fluorescents et plus particulièrement leurs sidérophores principaux, les pvds, peuvent intervenir favorablement dans la nutrition en fer du pois. Elles montrent également que ces effets pourraient jouer un rôle dans la tolérance à la chlorose ferrique.

Les deux cultivars de pois étudiés ont influencé différemment la structure de leur microbiote rhizosphérique. En particulier, les *Pseudomonas* spp. fluorescents associés au pois IDC tolérant T présentaient une meilleure aptitude à résister à la carence en fer que ceux du pois sensible S, suggérant ainsi un prélèvement de fer plus important de ce pois dans la rhizosphère. De plus, les pvds majoritairement produites par les isolats du pois T (pvd1T) et du pois S (pvd2S) étaient différentes. En retour, l'impact des deux pvds sur la nutrition en fer des pois a également varié ; la pvd majoritairement produite par les isolats issus d'un pois lui étant plus favorable que celle produite majoritairement par les isolats de l'autre pois. La boucle de rétroaction choisie comme schéma conceptuel à la base de cette étude apparaît donc bien adaptée à la description de la dynamique des interactions plante-microorganismes étudiées. Un cultivar de pois a recruté un microbiote rhizosphérique paraissant favorable à sa nutrition en fer. Cette observation peut aussi être étendue à la santé de la plante puisque les pvds des *Pseudomonas* associés aux pois présentaient un antagonisme à l'encontre d'*A. euteiches* et que les bactéries étaient capables de limiter la gravité de la maladie provoquée par ce pathogène. Toutefois, ces capacités étaient globalement partagées dans la rhizosphère des deux pois sans effet cultivar apparent, contrairement aux propriétés liées à l'acquisition du fer.

Les résultats obtenus ont permis de mettre en évidence des interactions spécifiques entre des types de pvds différents et des génotypes de plantes. Compte tenu de l'impact potentiel de ces interactions sur le statut en fer et en autres éléments nutritifs des plantes, il paraît important de les prendre en compte dans les travaux visant à améliorer la nutrition en fer et la qualité nutritionnelle des productions végétales. Cependant, d'autres dispositifs expérimentaux devront être utilisés afin d'étudier l'impact du microbiote sur les concentrations et sur les formes de fer, plus ou moins biodisponibles dans l'alimentation, des plantes et des graines matures.

Des apports en fer sous forme de ferripyoverdine ont été plus favorables à la nutrition en fer d'un cultivar de pois tolérant à la chlorose ferrique qu'à celle d'un cultivar de pois sensible. L'hypothèse selon laquelle la tolérance à la chlorose pourrait être, au moins en partie due à une meilleure aptitude à acquérir le fer via des sidérophores bactériens devra être vérifiée avec d'autres cultivars de pois et d'autres pvds. Pour cela, la validité des marqueurs potentiels de la sensibilité à la chlorose (expression de *FRO1* dans le bioessai développé) et des interactions favorables à la nutrition en fer entre une plante et une Fe-pvd (*FER1*, *FER4*, *MYB72*, *BGLU42* et *HBI1*) devra être évaluée. Ces travaux pourraient permettre d'identifier des cibles potentielles pour l'amélioration végétale permettant de sélectionner des génotypes valorisant au mieux les interactions avec les microorganismes de la rhizosphère. Toutefois, collectivement, nos résultats suggèrent que l'utilisation efficace des Fe-pvds pourrait impliquer un mécanisme d'acquisition non-réductif, possiblement un mécanisme d'endocytose, pour lequel nous ne disposons pas encore de marqueurs potentiels. Des progrès devront donc être réalisés dans la connaissance de ce système.

Références

- Agafonov, O., Selstø, C. H., Thorsen, K., Xu, X. M., Drengstig, T., and Ruoff, P. (2016). The Organization of controller motifs leading to robust plant iron homeostasis. *PLoS ONE* 11, e0147120. doi:10.1371/journal.pone.0147120.
- Ahmed, I., Kabir, A. H., Rahman, M. F., and Alam, F. (2015). In vitro screening of pea genotypes tolerant to iron deficiency based on physiological traits. *Int. J. Biosci.* 6, 460–467.
- Albrecht-Gary, A.-M., Blanc, S., Rochel, N., Ocaktan, A. Z., and Abdallah, M. A. (1994). Bacterial iron transport: coordination properties of pyoverdine PaA, a peptidic siderophore of *Pseudomonas aeruginosa*. *Inorg. Chem.* 33, 6391–6402. doi:10.1021/ic00104a059.
- Aznar, A., and Dellagi, A. (2015). New insights into the role of siderophores as triggers of plant immunity: what can we learn from animals? *J. Exp. Bot.* 66, 3001–3010. doi:10.1093/jxb/erv155.
- Bakker, P. A. H. M., Pieterse, C. M. J., and van Loon, L. C. (2007). Induced systemic resistance by fluorescent *Pseudomonas* spp. *Phytopathology* 97, 239–243. doi:10.1094/PHYTO-97-2-0239.
- Bar-Ness, E., Hadar, Y., Chen, Y., Shanzler, A., and Libman, J. (1992). Iron uptake by plants from microbial siderophores: a study with 7-nitrobenz-2-oxa-1,3-diazole-desferrioxamine as fluorescent ferrioxamine B analog. *Plant Physiol.* 99, 1329–1335. doi:10.1104/pp.99.4.1329.
- Becker, J. O., Hedges, R. W., and Messens, E. (1985b). Inhibitory effect of pseudobactin on the uptake of iron by higher plants. *Appl. Environ. Microbiol.* 49, 1090–1093.
- Becker, J. O., Messens, E., and Hedges, R. W. (1985a). The influence of agrobactin on the uptake of ferric iron by plants. *FEMS Microbiol. Ecol.* 31, 171–175.
- Bienfait, H. F., Briel, W. van den, and Mesland-Mul, N. T. (1985). Free space iron pools in roots: generation and mobilization. *Plant Physiol.* 78, 596–600. doi:10.1104/pp.78.3.596.
- Brear, E. M., Day, D. A., and Smith, P. M. C. (2013). Iron: an essential micronutrient for the legume-rhizobium symbiosis. *Front. Plant Sci.* 4, 359. doi:10.3389/fpls.2013.00359.
- Briat, J.-F., Dubos, C., and Gaymard, F. (2015). Iron nutrition, biomass production, and plant product quality. *Trends Plant Sci.* 20, 33–40. doi:10.1016/j.tplants.2014.07.005.
- Briat, J.-F., Ravet, K., Arnaud, N., Duc, C., Boucherez, J., Touraine, B., et al. (2010). New insights into ferritin synthesis and function highlight a link between iron homeostasis and oxidative stress in plants. *Ann. Bot.* 105, 811–822. doi:10.1093/aob/mcp128.
- Briskot, G., Taraz, K., and Budzikiewicz, H. (1989). Bacterial constituents, XXXVII. Pyoverdine-Type Siderophores from *Pseudomonas aeruginosa*. *Liebigs Ann. Chem.* 1989, 375–384. doi:10.1002/jlac.198919890164.
- Budzikiewicz, H. (2004). Siderophores of the Pseudomonadaceae sensu stricto (fluorescent and non-fluorescent *Pseudomonas* spp.). *Fortschritte Chem. Org. Naturstoffe Prog. Chem. Org. Nat. Prod. Progres Dans Chim. Subst. Org. Nat.* 87, 81–237. doi:doi.org/10.1007/978-3-7091-0581-8_2.
- Burstin, J., Gallardo, K., Mir, R. R., Varshney, R. K., and Duc, G. (2011). “Improving protein content and nutrition quality,” in *Biology and Breeding of Food Legumes*, eds. A. Pratap and J. Kumar (Wallingford, Oxfordshire, UK ; Cambridge, MA: CABI), 314–328.
- Cannon, W. B. (1929). Organization for physiological homeostasis. *Physiol. Rev.* 9, 399–431. doi:10.1152/physrev.1929.9.3.399.
- Carrillo-Castañeda, G., Muñoz, J. J., Peralta-Videa, J. R., Gomez, E., and Gardea-Torresdey, J. L. (2005). Modulation of uptake and translocation of iron and copper from root to shoot in common bean by siderophore-producing microorganisms. *J. Plant Nutr.* 28, 1853–1865. doi:10.1080/01904160500251340.
- Cézard, C., Farvacques, N., and Sonnet, P. (2015). Chemistry and biology of pyoverdines, *Pseudomonas* primary siderophores. *Curr. Med. Chem.* 22, 165–186. doi:10.2174/0929867321666141011194624.

- Chen, L., Dick, W. A., and Streeter, J. G. (2000). Production of aerobactin by microorganisms from a compost enrichment culture and soybean utilization. *J. Plant Nutr.* 23, 2047–2060. doi:10.1080/01904160009382164.
- Chen, Y., and Barak, P. (1982). “Iron nutrition of plants in calcareous soils,” in *Advances in Agronomy* (Elsevier), 217–240. doi:10.1016/S0065-2113(08)60326-0.
- Clemens, S. (2019). Metal ligands in micronutrient acquisition and homeostasis. *Plant Cell Environ.*, pce.13627. doi:10.1111/pce.13627.
- Clevenger, K. D., Mascarenhas, R., Catlin, D., Wu, R., Kelleher, N. L., Drake, E. J., et al. (2017). Substrate trapping in the siderophore tailoring enzyme PvdQ. *ACS Chem. Biol.* 12, 643–647. doi:10.1021/acscchembio.7b00031.
- Connorton, J. M., Balk, J., and Rodríguez-Celma, J. (2017). Iron homeostasis in plants – a brief overview. *Metallomics* 9, 813–823. doi:10.1039/C7MT00136C.
- Cornelis, P. (2010). Iron uptake and metabolism in pseudomonads. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 86, 1637–1645. doi:10.1007/s00253-010-2550-2.
- Cornell, R. M., and Schwertmann, U. (2003). *The iron oxides: structure, properties, reactions, occurrences and uses*. 1st ed. Wiley doi:10.1002/3527602097.
- Crowley, D. E., Reid, C. P., and Szaniszlo, P. J. (1988). Utilization of microbial siderophores in iron acquisition by oat. *Plant Physiol.* 87, 680–685. doi:doi.org/10.1104/pp.87.3.680.
- Curie, C., and Briat, J.-F. (2003). Iron transport and signaling in plants. *Annu. Rev. Plant Biol.* 54, 183–206. doi:10.1146/annurev.arplant.54.031902.135018.
- Curie, C., Cassin, G., Couch, D., Divol, F., Higuchi, K., Le Jean, M., et al. (2009). Metal movement within the plant: contribution of nicotianamine and yellow stripe 1-like transporters. *Ann. Bot.* 103, 1–11. doi:10.1093/aob/mcn207.
- Dahl, W. J., Foster, L. M., and Tyler, R. T. (2012). Review of the health benefits of peas (*Pisum sativum* L.). *Br. J. Nutr.* 108, S3–S10. doi:10.1017/S0007114512000852.
- Darbani, B., Briat, J.-F., Holm, P. B., Husted, S., Noeparvar, S., and Borg, S. (2013). Dissecting plant iron homeostasis under short and long-term iron fluctuations. *Biotechnol. Adv.* 31, 1292–1307. doi:10.1016/j.biotechadv.2013.05.003.
- de Santiago, A., García-López, A. M., Quintero, J. M., Avilés, M., and Delgado, A. (2013). Effect of *Trichoderma asperellum* strain T34 and glucose addition on iron nutrition in cucumber grown on calcareous soils. *Soil Biol. Biochem.* 57, 598–605. doi:10.1016/j.soilbio.2012.06.020.
- de Santiago, A., Quintero, J. M., Avilés, M., and Delgado, A. (2009). Effect of *Trichoderma asperellum* strain T34 on iron nutrition in white lupin. *Soil Biol. Biochem.* 41, 2453–2459. doi:10.1016/j.soilbio.2009.07.033.
- Drinkwater, L. E., Wagoner, P., and Sarrantonio, M. (1998). Legume-based cropping systems have reduced carbon and nitrogen losses. *Nature* 396, 262–265. doi:10.1038/24376.
- Duchene, O., Vian, J.-F., and Celette, F. (2017). Intercropping with legume for agroecological cropping systems: complementarity and facilitation processes and the importance of soil microorganisms. A review. *Agric. Ecosyst. Environ.* 240, 148–161. doi:10.1016/j.agee.2017.02.019.
- Duijff, B. J., De Kogel, W. J., Bakker, P. A. H. M., and Schippers, B. (1994). Influence of pseudobactin 358 on the iron nutrition of barley. *Soil Biol. Biochem.* 26, 1681–1688. doi:10.1016/0038-0717(94)90321-2.
- Dwivedi, S. L., Lammerts van Bueren, E. T., Ceccarelli, S., Grando, S., Upadhyaya, H. D., and Ortiz, R. (2017). Diversifying food systems in the pursuit of sustainable food production and healthy diets. *Trends Plant Sci.* 22, 842–856. doi:10.1016/j.tplants.2017.06.011.
- Expert, D., Enard, C., and Masclaux, C. (1996). The role of iron in plant host-pathogen interactions. *Trends Microbiol.* 4, 232–237. doi:10.1016/0966-842X(96)10038-X.
- Fan, M.-S., Zhao, F.-J., Fairweather-Tait, S. J., Poulton, P. R., Dunham, S. J., and McGrath, S. P. (2008). Evidence of decreasing mineral density in wheat grain over the last 160 years. *J. Trace Elem. Med. Biol.* 22, 315–324. doi:10.1016/j.jtemb.2008.07.002.

- FAO (2018). Food and agriculture Organization of the United States. www.fao.org/3/Y2809E/y2809e0j.htm. Available at: www.fao.org/3/Y2809E/y2809e0j.htm.
- FAOSTAT (2017). FAOSTAT. www.fao.org/faostat/en/#data/QC. Available at: <http://www.fao.org/faostat/en/#data/QC> [Accessed September 25, 2019].
- Ferreira, C. M. H., Sousa, C. A., Sanchis-Pérez, I., López-Rayó, S., Barros, M. T., Soares, H. M. V. M., et al. (2019). Calcareous soil interactions of the iron(III) chelates of DPH and Azotochelin and its application on amending iron chlorosis in soybean (*Glycine max*). *Sci. Total Environ.* 647, 1586–1593. doi:10.1016/j.scitotenv.2018.08.069.
- Folschweiller, N., Gallay, J., Vincent, M., Abdallah, M. A., Pattus, F., and Schalk, I. J. (2002). The interaction between pyoverdine and its outer membrane receptor in *Pseudomonas aeruginosa* leads to different conformers: a time-resolved fluorescence study. *Biochemistry* 41, 14591–14601. doi:10.1021/bi0259711.
- Fourcroy, P., Sisó-Terraza, P., Sudre, D., Savirón, M., Rey, G., Gaymard, F., et al. (2014). Involvement of the ABCG37 transporter in secretion of scopoletin and derivatives by *Arabidopsis* roots in response to iron deficiency. *New Phytol.* 201, 155–167. doi:10.1111/nph.12471.
- Fourcroy, P., Tissot, N., Gaymard, F., Briat, J.-F., and Dubos, C. (2016). Facilitated Fe nutrition by phenolic compounds excreted by the *Arabidopsis* ABCG37/PDR9 transporter requires the IRT1/FRO2 high-affinity root Fe²⁺ transport system. *Mol. Plant* 9, 485–488. doi:10.1016/j.molp.2015.09.010.
- Freitas, M. A., Medeiros, F. H. V., Carvalho, S. P., Guilherme, L. R. G., Teixeira, W. D., Zhang, H., et al. (2015). Augmenting iron accumulation in cassava by the beneficial soil bacterium *Bacillus subtilis* (GBO3). *Front. Plant Sci.* 6, 596. doi:10.3389/fpls.2015.00596.
- Garrido-Sanz, D., Meier-Kolthoff, J. P., Göker, M., Martín, M., Rivilla, R., and Redondo-Nieto, M. (2016). Genomic and Genetic Diversity within the *Pseudomonas fluorescens* Complex. *PLoS ONE* 11, e0150183. doi:10.1371/journal.pone.0150183.
- Gaulin, E., Jacquet, C., Bottin, A., and Dumas, B. (2007). Root rot disease of legumes caused by *Aphanomyces euteiches*. *Mol. Plant Pathol.* 8, 539–548. doi:10.1111/j.1364-3703.2007.00413.x.
- Ge, L., and Seah, S. Y. K. (2006). Heterologous expression, purification, and characterization of an L-Ornithine N5-Hydroxylase involved in pyoverdine siderophore biosynthesis in *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Bacteriol.* 188, 7205–7210. doi:10.1128/JB.00949-06.
- Gessard, M. C. (1892). Sur la fonction fluorescigène des microbes. *AnnInst Pasteur Paris*, 801–823.
- Ghosh, U. D., Saha, C., Maiti, M., Lahiri, S., Ghosh, S., Seal, A., et al. (2014). Root associated iron oxidizing bacteria increase phosphate nutrition and influence root to shoot partitioning of iron in tolerant plant *Typha angustifolia*. *Plant Soil* 381, 279–295. doi:10.1007/s11104-014-2085-x.
- Gildersleeve, R. R., and Ocumpaugh, W. R. (1989). Greenhouse evaluation of subterranean clover species for susceptibility to iron-deficiency chlorosis. *Crop Sci.* 29, 949–951.
- Gomila, M., Pena, A., Mulet, M., Lalucat, J., and Garci-a-Valdés, E. (2015). Phylogenomics and systematics in *Pseudomonas*. *Front. Microbiol.* 6, 214. doi:10.3389/fmicb.2015.00214.
- Grillet, L., Lan, P., Li, W., Mokkaapati, G., and Schmidt, W. (2018). IRON MAN is a ubiquitous family of peptides that control iron transport in plants. *Nat. Plants* 4, 953. doi:10.1038/s41477-018-0266-y.
- Grillet, L., and Schmidt, W. (2019). Iron acquisition strategies in land plants: not so different after all. *New Phytol.*, nph.16005. doi:10.1111/nph.16005.
- Guerinot, M. L., and Yi, Y. (1994). Iron: nutritious, noxious, and not readily available. *Plant Physiol.* 104, 815–820. doi:10.1104/pp.104.3.815.
- Harmsen, J. G., Rulkens, W. H., and Eijsackers, H. (2005). Bioavailability: concept for understanding or tool for predicting? *Land Contam. Reclam.* 13.
- Harris, W. R., Sammons, R. D., and Grabiak, R. C. (2012). A speciation model of essential trace metal ions in phloem. *J. Inorg. Biochem.* 116, 140–150. doi:10.1016/j.jinorgbio.2012.07.011.

- Hartney, S. L., Mazurier, S., Girard, M. K., Mehnaz, S., Davis, E. W., Gross, H., et al. (2013). Ferric-pyoverdine recognition by Fpv outer membrane proteins of *Pseudomonas protegens* Pf-5. *J. Bacteriol.* 195, 765–776. doi:10.1128/JB.01639-12.
- Hay, B. P., Dixon, D. A., Vargas, R., Garza, J., and Raymond, K. N. (2001). Structural criteria for the rational design of selective ligands. 3. quantitative structure–stability relationship for iron(III) complexation by tris-catecholamide siderophores. *Inorg. Chem.* 40, 3922–3935. doi:10.1021/ic001380s.
- Helms, T. C., Scott, R. A., Schapaugh, W. T., Goos, R. J., Franzen, D. W., and Schlegel, A. J. (2010). Soybean iron-deficiency chlorosis tolerance and yield decrease on calcareous soils. *Agron. J.* 102, 492. doi:10.2134/agronj2009.0317.
- Hider, R. C., and Kong, X. (2010). Chemistry and biology of siderophores. *Nat. Prod. Rep.* 27, 637. doi:10.1039/b906679a.
- Hirayama, T., Lei, G. J., Yamaji, N., Nakagawa, N., and Ma, J. F. (2018). The putative peptide gene FEP1 regulates iron deficiency response in *Arabidopsis*. *Plant Cell Physiol.* 59, 1739–1752. doi:10.1093/pcp/pcy145.
- Hördt, W., Römheld, V., and Winkelmann, G. (2000). Fusarinines and dimerum acid, mono- and dihydroxamate siderophores from *Penicillium chrysogenum*, improve iron utilization by strategy I and strategy II plants. *BioMetals* 13, 10.
- Ichinose, Y., Taguchi, F., and Mukaiyama, T. (2013). Pathogenicity and virulence factors of *Pseudomonas syringae*. *J. Gen. Plant Pathol.* 79, 285–296. doi:10.1007/s10327-013-0452-8.
- Ishimaru, Y., Suzuki, M., Tsukamoto, T., Suzuki, K., Nakazono, M., Kobayashi, T., et al. (2006). Rice plants take up iron as an Fe³⁺-phytosiderophore and as Fe²⁺. *Plant J.* 45, 335–346. doi:10.1111/j.1365-313X.2005.02624.x.
- Jain, A., Singh, A., Chaudhary, A., Singh, S., and Singh, H. B. (2014). Modulation of nutritional and antioxidant potential of seeds and pericarp of pea pods treated with microbial consortium. *Food Res. Int.* 64, 275–282. doi:10.1016/j.foodres.2014.06.033.
- Jin, C. W., Li, G. X., Yu, X. H., and Zheng, S. J. (2010). Plant Fe status affects the composition of siderophore-secreting microbes in the rhizosphere. *Ann. Bot.* 105, 835–841. doi:10.1093/aob/mcq071.
- Jin, C. W., Ye, Y. Q., and Zheng, S. J. (2014). An underground tale: contribution of microbial activity to plant iron acquisition via ecological processes. *Ann. Bot.* 113, 7–18. doi:10.1093/aob/mct249.
- Jin, C. W., You, G. Y., He, Y. F., Tang, C., Wu, P., and Zheng, S. J. (2007). Iron deficiency-induced secretion of phenolics facilitates the reutilization of root apoplastic iron in red clover. *Plant Physiol.* 144, 278–285. doi:10.1104/pp.107.095794.
- Jones, P., Garcia, B. J., Furches, A., Tuskan, G. A., and Jacobson, D. (2019). Plant host-associated mechanisms for microbial selection. *Front. Plant Sci.* 10, 862. doi:10.3389/fpls.2019.00862.
- Kim, S. A., and Guerinot, M. L. (2007). Mining iron: iron uptake and transport in plants. *FEBS Lett.* 581, 2273–2280. doi:10.1016/j.febslet.2007.04.043.
- King, E. O., Ward, M. K., and Raney, D. E. (1954). Two simple media for the demonstration of pyocyanin and fluorescein. *J. Lab. Clin. Med.* 44, 301–307. doi:10.5555/uri:pii:002221435490222X.
- Kloepper, J. W., Leong, J., Teintze, M., and Schroth, M. N. (1980). *Pseudomonas* siderophores: A mechanism explaining disease-suppressive soils. *Curr. Microbiol.* 4, 317–320. doi:10.1007/BF02602840.
- Kobae, Y., Tomioka, R., Tanoi, K., Kobayashi, N. I., Ohmori, Y., Nishida, S., et al. (2014). Selective induction of putative iron transporters, *OPT8a* and *OPT8b*, in maize by mycorrhizal colonization. *Soil Sci. Plant Nutr.* 60, 843–847. doi:10.1080/00380768.2014.949854.
- Kobayashi, T., and Nishizawa, N. K. (2012). Iron uptake, translocation, and regulation in higher plants. *Annu. Rev. Plant Biol.* 63, 131–152. doi:10.1146/annurev-arplant-042811-105522.
- Koen, E., Besson-Bard, A., Duc, C., Astier, J., Gravot, A., Richaud, P., et al. (2013). *Arabidopsis thaliana* nicotianamine synthase 4 is required for proper response to iron deficiency and to cadmium exposure. *Plant Sci.* 209, 1–11. doi:10.1016/j.plantsci.2013.04.006.

- Labidi, S., Ben Jeddi, F., Tisserant, B., Debiane, D., Rezgui, S., Grandmougin-Ferjani, A., et al. (2012). Role of arbuscular mycorrhizal symbiosis in root mineral uptake under CaCO₃ stress. *Mycorrhiza* 22, 337–345. doi:10.1007/s00572-011-0405-z.
- Lanquar, V., Lelièvre, F., Bolte, S., Hamès, C., Alcon, C., Neumann, D., et al. (2005). Mobilization of vacuolar iron by AtNRAMP3 and AtNRAMP4 is essential for seed germination on low iron. *EMBO J.* 24, 4041–4051. doi:10.1038/sj.emboj.7600864.
- Leeman, M. (Utrecht U., Ouden, F. M. den, Pelt, J. A. van, Dirkx, F. P. M., Steijl, H., Bakker, P. a. H. M., et al. (1996). Iron availability affects induction of systemic resistance to Fusarium wilt of radish by *Pseudomonas fluorescens*. *Phytopathology*. Available at: <http://agris.fao.org/agris-search/search.do?recordID=US9729522> [Accessed January 6, 2020].
- Lemanceau, P., and Alabouvette, C. (1991). Biological control of fusarium diseases by fluorescent *Pseudomonas* and non-pathogenic Fusarium. *Crop Prot.* 10, 279–286. doi:10.1016/0261-2194(91)90006-D.
- Lemanceau, P., Bakker, P. A., De Kogel, W. J., Alabouvette, C., and Schippers, B. (1992). Effect of pseudobactin 358 production by *Pseudomonas putida* WCS358 on suppression of fusarium wilt of carnations by nonpathogenic *Fusarium oxysporum* Fo47. *Appl. Environ. Microbiol.* 58, 2978–2982.
- Lemanceau, P., Bakker, P. A., De Kogel, W. J., Alabouvette, C., and Schippers, B. (1993). Antagonistic effect of nonpathogenic *Fusarium oxysporum* Fo47 and pseudobactin 358 upon pathogenic *Fusarium oxysporum* sp. dianthi. *Appl. Environ. Microbiol.* 59, 74–82.
- Lemanceau, P., Barret, M., Mazurier, S., Mondy, S., Pivato, B., Fort, T., et al. (2017a). “Plant communication with associated microbiota in the spermosphere, rhizosphere and phyllosphere,” in *Advances in Botanical Research* (Elsevier), 101–133. doi:10.1016/bs.abr.2016.10.007.
- Lemanceau, P., Bauer, P., Kraemer, S., and Briat, J.-F. (2009). Iron dynamics in the rhizosphere as a case study for analyzing interactions between soils, plants and microbes. *Plant Soil* 321, 513–535. doi:10.1007/s11104-009-0039-5.
- Lemanceau, P., Blouin, M., Muller, D., and Moënne-Loccoz, Y. (2017b). Let the core microbiota be functional. *Trends Plant Sci.* 22, 583–595. doi:10.1016/j.tplants.2017.04.008.
- Leyval, C., and Reid, C. P. P. (1991). Utilization of microbial siderophores by mycorrhizal and non-mycorrhizal pine roots. *New Phytol.* 119, 93–98. doi:10.1111/j.1469-8137.1991.tb01011.x.
- Lobreaux, S., Massenet, O., and Briat, J. F. (1992). Iron induces ferritin synthesis in maize plantlets. *Plant Mol. Biol.* 19, 563–575. doi:10.1007/bf00026783.
- Longnecker, N., and Welch, R. M. (1990). Accumulation of apoplastic iron in plant roots: a factor in the resistance of soybeans to iron-deficiency induced chlorosis? *Plant Physiol.* 92, 17–22. doi:10.1104/pp.92.1.17.
- Mahmoudi, H., Koyro, H.-W., Debez, A., and Abdelly, C. (2009). Comparison of two chickpea varieties regarding their responses to direct and induced Fe deficiency. *Environ. Exp. Bot.* 66, 349–356. doi:10.1016/j.envexpbot.2009.03.013.
- Manthey, J. A., Tisserat, B., and Crowley, D. E. (1996). Root responses of sterile-grown onion plants to iron deficiency. *J. Plant Nutr.* 19, 145–161. doi:10.1080/01904169609365113.
- Maurhofer, M., Reimann, C., Schmidli-Sacherer, P., Heeb, S., Haas, D., and Défago, G. (1998). Salicylic acid biosynthetic genes expressed in *Pseudomonas fluorescens* strain P3 improve the induction of systemic resistance in tobacco against tobacco necrosis virus. *Phytopathology* 88, 678–684. doi:10.1094/PHTO.1998.88.7.678.
- Meyer, J. M., and Abdallah, M. A. (1978). The fluorescent pigment of *Pseudomonas fluorescens*: biosynthesis, purification and physicochemical properties. *Microbiology* 107, 319–328. doi:doi.org/10.1099/00221287-107-2-319.
- Meyer, J.-M., Gruffaz, C., Tulkki, T., and Izard, D. (2007). Taxonomic heterogeneity, as shown by siderotyping, of strains primarily identified as *Pseudomonas putida*. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 57, 2543–2556. doi:10.1099/ijs.0.65233-0.

- Mishra, P. K., Bisht, S. C., Ruwari, P., Joshi, G. K., Singh, G., Bisht, J. K., et al. (2011). Bioassociative effect of cold tolerant *Pseudomonas* spp. and *Rhizobium leguminosarum*-PR1 on iron acquisition, nutrient uptake and growth of lentil (*Lens culinaris* L.). *Eur. J. Soil Biol.* 47, 35–43. doi:10.1016/j.ejsobi.2010.11.005.
- Nagata, T. (2017). Effect of *Pseudomonas fluorescens* inoculation on the improvement of iron deficiency in tomato. *Plant Root* 11, 1–9. doi:10.3117/plantroot.11.1.
- Nagata, T., Oobo, T., and Aozasa, O. (2013). Efficacy of a bacterial siderophore, pyoverdine, to supply iron to *Solanum lycopersicum* plants. *J. Biosci. Bioeng.* 115, 686–690. doi:10.1016/j.jbiosc.2012.12.018.
- Naranjo-Arcos, M. A., Maurer, F., Meiser, J., Pateyron, S., Fink-Straube, C., and Bauer, P. (2017). Dissection of iron signalling and iron accumulation by overexpression of subgroup Ib bHLH039 protein. *Sci. Rep.* 7, 10911. doi:10.1038/s41598-017-11171-7.
- Nouet, C., Motte, P., and Hanikenne, M. (2011). Chloroplastic and mitochondrial metal homeostasis. *Trends Plant Sci.* 16, 395–404. doi:10.1016/j.tplants.2011.03.005.
- Offre, P., Pivato, B., Mazurier, S., Siblot, S., Berta, G., Lemanceau, P., et al. (2008). Microdiversity of Burkholderiales associated with mycorrhizal and nonmycorrhizal roots of *Medicago truncatula*. *FEMS Microbiol. Ecol.* 65, 180–192. doi:10.1111/j.1574-6941.2008.00504.x.
- ONU (2019). La population. *Organ. N. U.* Available at: <https://www.un.org/fr/sections/issues-depth/population/index.html>.
- Palmer, C. M., Hindt, M. N., Schmidt, H., Clemens, S., and Guerinot, M. L. (2013). MYB10 and MYB72 are required for growth under iron-limiting conditions. *PLoS Genet.* 9, e1003953. doi:10.1371/journal.pgen.1003953.
- Pieterse, C. M. J., Zamioudis, C., Berendsen, R. L., Weller, D. M., Van Wees, S. C. M., and Bakker, P. A. H. M. (2014). Induced systemic resistance by beneficial microbes. *Annu. Rev. Phytopathol.* 52, 347–375. doi:10.1146/annurev-phyto-082712-102340.
- Pourbabaee, A. A., shoai, F., Emami, S., and Alikhani, H. A. (2018). The potential contribution of siderophore producing bacteria on growth and Fe ion concentration of sunflower (*Helianthus annuus* L.) under water stress. *J. Plant Nutr.* 41, 619–626. doi:10.1080/01904167.2017.1406112.
- Radzki, W., Gutierrez Mañero, F. J., Algar, E., Lucas García, J. A., García-Villaraco, A., and Ramos Solano, B. (2013). Bacterial siderophores efficiently provide iron to iron-starved tomato plants in hydroponics culture. *Antonie Van Leeuwenhoek* 104, 321–330. doi:10.1007/s10482-013-9954-9.
- Ran, L. X., Li, Z. N., Wu, G. J., Loon, L. C. van, and Bakker, P. a. H. M. (2005). Induction of systemic resistance against bacterial wilt in eucalyptus urophylla by fluorescent *Pseudomonas* spp. *Eur. J. Plant Pathol.* 113, 59–70. doi:10.1007/s10658-005-0623-3.
- Ravel, J., and Cornelis, P. (2003). Genomics of pyoverdine-mediated iron uptake in pseudomonads. *Trends Microbiol.* 11, 195–200. doi:10.1016/s0966-842x(03)00076-3.
- Ravet, K., Touraine, B., Boucherez, J., Briat, J.-F., Gaymard, F., and Cellier, F. (2009). Ferritins control interaction between iron homeostasis and oxidative stress in *Arabidopsis*. *Plant J.* 57, 400–412. doi:10.1111/j.1365-313X.2008.03698.x.
- Rellán-Alvarez, R., Abadía, J., and Alvarez-Fernández, A. (2008). Formation of metal-nicotianamine complexes as affected by pH, ligand exchange with citrate and metal exchange. A study by electrospray ionization time-of-flight mass spectrometry. *Rapid Commun. Mass Spectrom. RCM* 22, 1553–1562. doi:10.1002/rcm.3523.
- Reza, M., and al, al (2017). Assessing the effect of siderophore producing bacteria for the iron nutrition in lentil and pea.
- Ringel, M. T., and Brüser, T. (2018). The biosynthesis of pyoverdines. *Microb. Cell* 5, 424–437. doi:10.15698/mic2018.10.649.
- Ringel, M. T., Dräger, G., and Brüser, T. (2017). The periplasmic transaminase PtaA of *Pseudomonas fluorescens* converts the glutamic acid residue at the pyoverdine fluorophore to α -ketoglutaric acid. *J. Biol. Chem.* 292, 18660–18671. doi:10.1074/jbc.M117.812545.

- Robin, A., Mazurier, S., Mougél, C., Vansuyt, G., Corberand, T., Meyer, J.-M., et al. (2007). Diversity of root-associated fluorescent pseudomonads as affected by ferritin overexpression in tobacco: diversity of fluorescent pseudomonads in rhizosphere. *Environ. Microbiol.* 9, 1724–1737. doi:10.1111/j.1462-2920.2007.01290.x.
- Robin, A., Vansuyt, G., Hinsinger, P., Meyer, J. M., Briat, J. F., and Lemanceau, P. (2008). “Chapter 4 Iron dynamics in the rhizosphere,” in *Advances in Agronomy* (Elsevier), 183–225. Available at: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0065211308004045>.
- Sandy, M., and Butler, A. (2009). Microbial iron acquisition: marine and terrestrial siderophores. *Chem. Rev.* 109, 4580–4595. doi:10.1021/cr9002787.
- Scher, F. M., and Baker, R. (1982). Effect of *Pseudomonas putida* and a synthetic iron chelator on induction of soil suppressiveness to Fusarium wilt pathogens. *Phytopathology* 72, 1567–1573.
- Schmid, N. B., Giehl, R. F. H., Döll, S., Mock, H.-P., Strehmel, N., Scheel, D., et al. (2014). Feruloyl-CoA 6'-Hydroxylase1-dependent coumarins mediate iron acquisition from alkaline substrates in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* 164, 160–172. doi:10.1104/pp.113.228544.
- Schmidt, H., Günther, C., Weber, M., Spörlein, C., Loscher, S., Böttcher, C., et al. (2014). Metabolome analysis of *Arabidopsis thaliana* roots identifies a key metabolic pathway for iron acquisition. *PLoS ONE* 9, e102444. doi:10.1371/journal.pone.0102444.
- Segond, D., Dellagi, A., Lanquar, V., Rigault, M., Patrit, O., Thomine, S., et al. (2009). NRAMP genes function in *Arabidopsis thaliana* resistance to *Erwinia chrysanthemi* infection. *Plant J.* 58, 195–207. doi:10.1111/j.1365-313X.2008.03775.x.
- Sharma, A., Shankhdhar, D., and Shankhdhar, S. C. (2013). Enhancing grain iron content of rice by the application of plant growth promoting rhizobacteria. *Plant Soil Environ.* 59, 89–94. doi:10.17221/683/2012-PSE.
- Shenker, M., Chen, Y., Ghirlando, R., Oliver, I., Helmann, M., and Hadar, Y. (1995). Chemical structure and biological activity of a siderophore produced by *Rhizopus arrhizus*. *Soil Sci. Soc. Am. J.* 59, 837. doi:10.2136/sssaj1995.03615995005900030029x.
- Shipton, P. J. (1977). Monoculture and soilborne plant pathogens. *Annu. Rev. Phytopathol.* 15, 387–407. doi:10.1146/annurev.py.15.090177.002131.
- Shirley, M., Avoscan, L., Bernaud, E., Vansuyt, G., and Lemanceau, P. (2011). Comparison of iron acquisition from Fe-pyoverdine by strategy I and strategy II plants. *Botany* 89, 731–735. doi:10.1139/b11-054.
- Singh, D., Geat, N., Rajawat, M. V. S., Mahajan, M. M., Prasanna, R., Singh, S., et al. (2017). Deciphering the mechanisms of endophyte-mediated biofortification of Fe and Zn in wheat. *J. Plant Growth Regul.* 37, 174–182. doi:10.1007/s00344-017-9716-4.
- Singh, D., Geat, N., Rajawat, M. V. S., Prasanna, R., Kar, A., Singh, A. M., et al. (2018). Prospecting endophytes from different Fe or Zn accumulating wheat genotypes for their influence as inoculants on plant growth, yield, and micronutrient content. *Ann. Microbiol.* 68, 815–833. doi:10.1007/s13213-018-1388-1.
- Stringlis, I. A., Yu, K., Feussner, K., de Jonge, R., Van Bentum, S., Van Verk, M. C., et al. (2018). MYB72-dependent coumarin exudation shapes root microbiome assembly to promote plant health. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 115, E5213–E5222. doi:10.1073/pnas.1722335115.
- Trapet, P., Avoscan, L., Klinguer, A., Pateyron, S., Citerne, S., Chervin, C., et al. (2016). The *Pseudomonas fluorescens* siderophore pyoverdine weakens *Arabidopsis thaliana* defense in favor of growth in iron-deficient conditions. *Plant Physiol.* 171, 675–693. doi:10.1104/pp.15.01537.
- Tsai, H. H., and Schmidt, W. (2017). Mobilization of iron by plant-borne coumarins. *Trends Plant Sci.* 22, 538–548. doi:10.1016/j.tplants.2017.03.008.
- van Loon, L. C., Bakker, P. A., van der Heijden, W. H., Wendehenne, D., and Pugin, A. (2008). Early responses of tobacco suspension cells to rhizobacterial elicitors of induced systemic resistance. *Mol. Plant. Microbe Interact.* 21, 1609–1621. doi:doi.org/10.1094/MPMI-21-12-1609.
- van Rhijn, P., and Vanderleyden, J. (1995). The Rhizobium-plant symbiosis. *Microbiol. Rev.* 59, 124–142.

- Vansuyt, G., Robin, A., Briat, J.-F., Curie, C., and Lemanceau, P. (2007). Iron acquisition from Fe-pyoverdine by *Arabidopsis thaliana*. *Mol. Plant. Microbe Interact.* 20, 441–447. doi:doi.org/10.1094/MPMI-20-4-0441.
- Visca, P., Ciervo, A., and Orsi, N. (1994). Cloning and nucleotide sequence of the pvdA gene encoding the pyoverdine biosynthetic enzyme L-ornithine N5-oxygenase in *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Bacteriol.* 176, 1128–1140. doi:10.1128/jb.176.4.1128-1140.1994.
- Visca, P., Imperi, F., and Lamont, I. L. (2007). Pyoverdine siderophores: from biogenesis to biosignificance. *Trends Microbiol.* 15, 22–30. doi:10.1016/j.tim.2006.11.004.
- Wakeel, A., Farooq, M., Bashir, K., and Ozturk, L. (2018). “Micronutrient malnutrition and biofortification: recent advances and future perspectives,” in *Plant micronutrient use efficiency* (Elsevier), 225–243. doi:10.1016/B978-0-12-812104-7.00017-4.
- Wang, J., Zhou, C., Xiao, X., Xie, Y., Zhu, L., and Ma, Z. (2017). Enhanced iron and selenium uptake in plants by volatile emissions of *Bacillus amyloliquefaciens* (BF06). *Appl. Sci.* 7, 85. doi:10.3390/app7010085.
- Wang, Y., Brown, H. N., Crowley, D. E., and Szaniszlo, P. J. (1993). Evidence for direct utilization of a siderophore, ferrioxamine B, in axenically grown cucumber. *Plant Cell Environ.* 16, 579–585. doi:10.1111/j.1365-3040.1993.tb00906.x.
- Waters, B. M., McInturf, S. A., and Stein, R. J. (2012). Rosette iron deficiency transcript and microRNA profiling reveals links between copper and iron homeostasis in *Arabidopsis thaliana*. *J. Exp. Bot.* 63, 5903–5918. doi:10.1093/jxb/ers239.
- Winterbourn, C. C. (1995). Toxicity of iron and hydrogen peroxide: the Fenton reaction. *Toxicol. Lett.* 82–83, 969–974. doi:10.1016/0378-4274(95)03532-X.
- World Health Organization (2019). WHO. *Anémie Ferriprive*. Available at: <https://www.who.int/nutrition/topics/ida/fr/>.
- World Health Organization, W. (2018). *Global nutrition policy review 2016-2017: country progress in creating enabling policy environments for promoting healthy diets and nutrition.*, ed. H. Cadman Geneva.
- Xiong, H., Kakei, Y., Kobayashi, T., Guo, X., Nakazono, M., Takahashi, H., et al. (2013). Molecular evidence for phytosiderophore-induced improvement of iron nutrition of peanut intercropped with maize in calcareous soil. *Plant Cell Environ.* 36, 1888–1902. doi:10.1111/pce.12097.
- Yakop, U. M. (2012). Physiological and genetic investigations of iron deficiency in field peas (*Pisum sativum* L.). Available at: <https://digital.library.adelaide.edu.au/dspace/handle/2440/78660> [Accessed September 25, 2019].
- Yehuda, Z., Shenker, M., Hadar, Y., and Chen, Y. (2000). Remedy of chlorosis induced by iron deficiency in plants with the fungal siderophore rhizoferrin. *J. Plant Nutr.* 23, 1991–2006. doi:10.1080/01904160009382160.
- Zielińska-Dawidziak, M. (2015). Plant ferritin—a source of iron to prevent its deficiency. *Nutrients* 7, 1184–1201. doi:10.3390/nu7021184.
- Zhang, H., Sun, Y., Xie, X., Kim, M.-S., Dowd, S. E., and Paré, P. W. (2009). A soil bacterium regulates plant acquisition of iron via deficiency-inducible mechanisms. *Plant J.* 58, 568–577. doi:10.1111/j.1365-313X.2009.03803.x.
- Zhou, C., Guo, J., Zhu, L., Xiao, X., Xie, Y., Zhu, J., et al. (2016). *Paenibacillus polymyxa* BFKC01 enhances plant iron absorption via improved root systems and activated iron acquisition mechanisms. *Plant Physiol. Biochem.* 105, 162–173. doi:10.1016/j.plaphy.2016.04.025.
- Zhou, C., Zhu, L., Ma, Z., and Wang, J. (2018). Improved iron acquisition of *Astragalus sinicus* under low iron-availability conditions by soil-borne bacteria *Burkholderia cepacia*. *J. Plant Interact.* 13, 9–20. doi:10.1080/17429145.2017.1407000.
- Zribi, K., and Gharsalli, M. (2002). Effect of bicarbonate on growth and iron nutrition of pea. *J. Plant Nutr.* 25, 2143–2149. doi:10.1081/PLN-120014066.

Curriculum Vitæ

qPCR
Microbial ecology

Ionome analysis

Biofortification

Pseudomonads

Molecular study

Bacteria

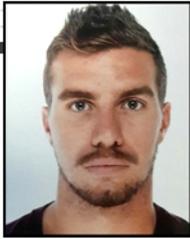
Iron

Plant

X-ray experiment

Pyoverdine

Interaction



PhD in environmental microbiology

Tristan LURTHY, 25/06/1991, tlurthy@gmail.com

Profil presentation

Introduction

Interested in things living around me, it's with the biology I answer to my curiosity since my young age. Since the University, I got a high interest in microbiology due to its relevant impact on enhancement of "human life. Ecology issues are in constant increase, that's why I am trying to understand plant-microbe interaction to find a use to improve quantity and quality of human food. We are going to highlight how I managed my studies until my PhD to acquire my specific skills.

Results and discussion :

Master degree internship, 6 months

My first research aimed to understand the gene expression mechanisms of a specific nitrogen fixing symbioses, actinorhizal symbioses between the actinobacteria *Frankia* and the alder. First, I realized a [bibliography report](#) on the expression of effectors playing a role in actinorhizal symbiosis and Rhizobium-legume symbiosis. *This exercise has allowed me to develop a synthetical scientific spirit in selecting essential information in scientific articles.*

Then, I carried out a functional study of *Frankia* ACN14a's genes and their potential role in organic nitrogen uptake (**Figure 1**). The results was finalized by [an article](#); [Lurthy et al., 2018](#), *Molecular response to nitrogen starvation by Frankia alni ACN14a revealed by transcriptomics and functional analysis with a fosmid library in Escherichia coli*, *Research in microbiology* Volume 169, Issue 2, Pages 90-100, doi.org/10.1016/j.resmic.2017.12.002

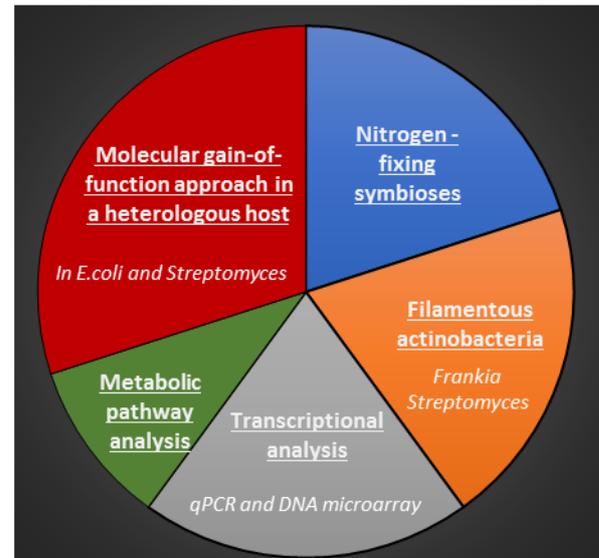


Figure 1: Master internship skills

PhD project in environmental microbiology

My PhD project deals with "Interaction between pea (*Pisum Sativum*) and the rhizospheric bacteria (*Pseudomonas*): consequences on plant iron nutrition, the growth and the plant health ».

I'm studying the impact of pea genetic on root associated bacteria and in return, the impact of this mediated microbiota on plant iron nutrition and plant health. And more specifically, I'm interesting by fluorescent pseudomonads which produced a specific siderophore, the pyoverdine, able to improve iron nutrition in plant model as *Arabidopsis* and *Tobacco*.

Through these studies, I developed significant skills to characterize plant-bacteria interaction outlined in **Figure 2**. This work lead to 3 submitted articles and 2 articles in progress :

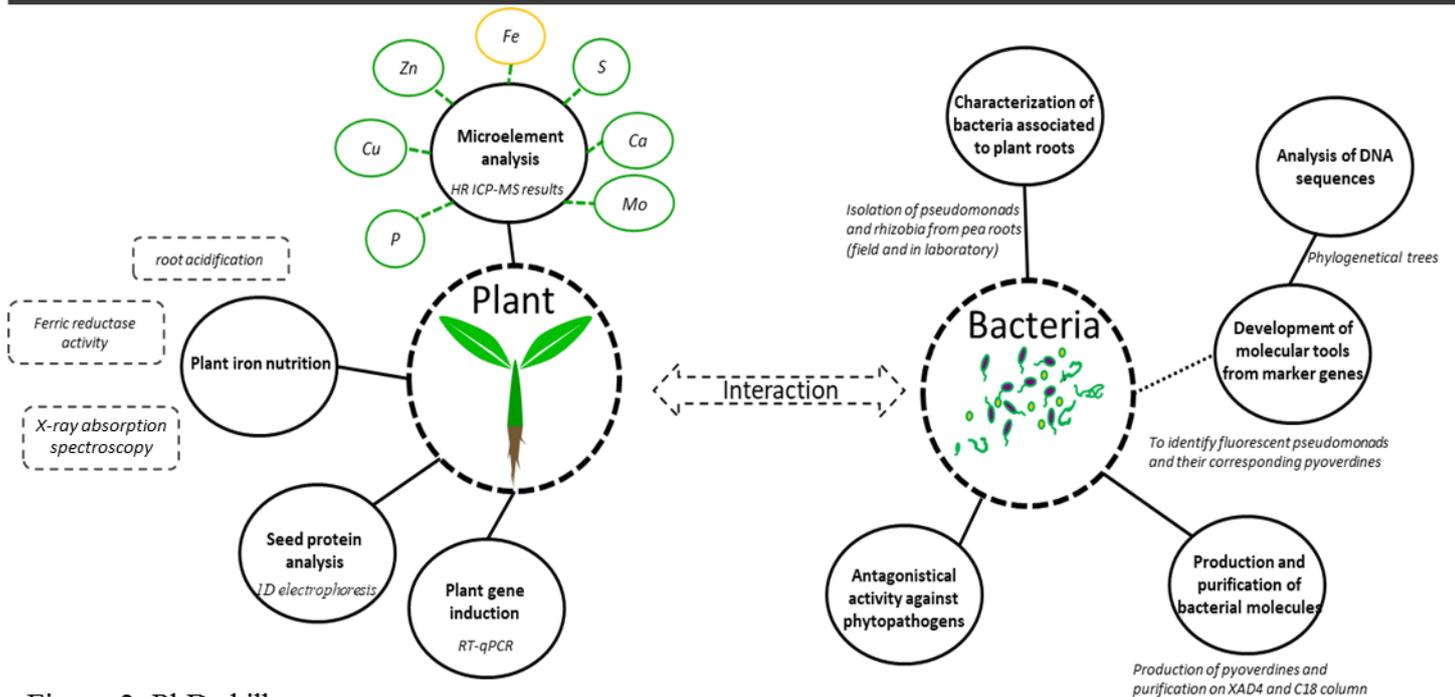


Figure 2: PhD skills

Materials and Method : How and when I did it ?

Education

2016-2019 PhD thesis, at INRA Dijon.

“Interaction between *Pisum Sativum* and *Pseudomonads*: consequences on plant iron nutrition, the growth and the plant health ”.

Carrying out at the UMR1347 INRA Dijon, France, “multitrophical interaction in the rhizosphere” team led by Philippe Lemanceau and supervised by Sylvie Mazurier,

2013-2015 Research Master degree “microbial ecology”, with distinction (4th /16), at Claude Bernard University, Lyon 1, France.

“ Functional study of genes of the nitrogen fixing symbiotic bacteria *Frankia* ACN14a”

Carried out at the UMR5557 ecologie microbienne in the actinorhizal team led by Philippe Normand and supervised by Hasna Boubakri

2011-2013 Bachelor of Science degree in biology option in microbiology, at Joseph Fourier University, Grenoble, France.

Scientific management

2 master students (6 months) and **1 technician certificate** (2 times 2 months) were supervised on my PhD time.

Moreover, **64 hours of cellular biology lecture** were given at UBFC university for Bachelor degree.

Scientific tools

Statistical computing and graphics were performed on *R studio* (®). DNA sequence were analyzed on *Seaview* or *Mega7* (®). Images were examined on *ImageQuant*. qPCR samples were run on *lighCycler480SW 1.5*

Supplementary data

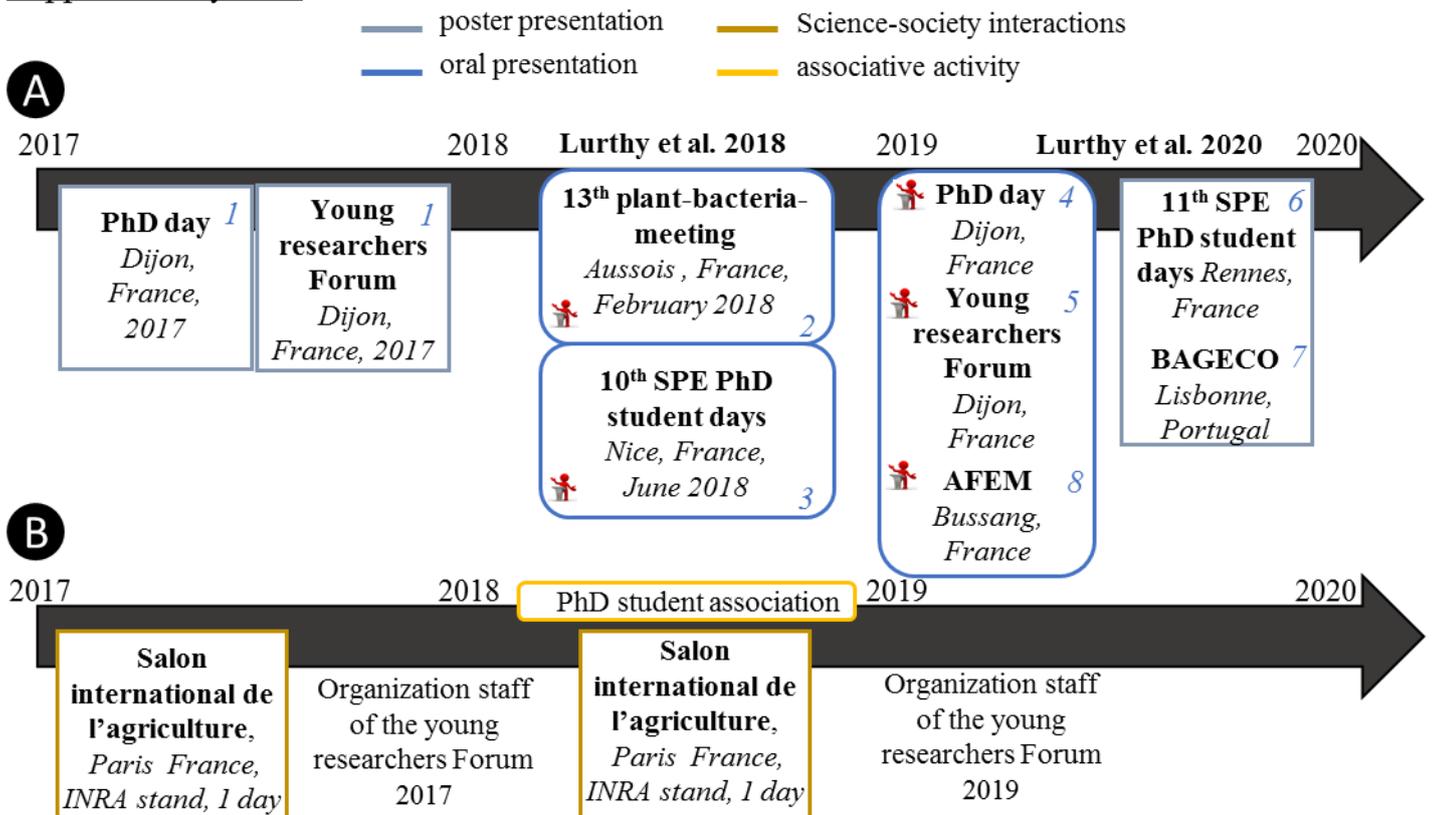


Figure 3: A/ Scientific communications and B/ Scientific activities

Lurthy *et al.*, 2018. Molecular response to nitrogen starvation by *Frankia alni* ACN14a revealed by transcriptomics and functional analysis with a fosmid library in *Escherichia coli*, *Research in microbiology*, 169, Issue 2, 90-100, doi.org/10.1016/j.resmic.2017.12.002

Lemanceau, P., Avoscan, L., Lemaitre J.-P., Lurthy T., Mazurier, S., Pivato B. (2019). Compréhension et valorisation des interactions entre plantes et microorganismes telluriques : un enjeu majeur en agroécologie. *Le Sélectionneur Français*, 70, 53-64.

Lurthy *et al.*, 2020. Impact of bacterial siderophores on iron status and ionome in pea. Submitted to *Frontiers in Plant Science*

- 1) Interaction *Pisum sativum* (pois)- *Pseudomonas* : Conséquences sur la nutrition en fer, la croissance et l'immunité de la plante hôte (partie 1). (2017-04-10). [Tristan LURTHY](#), Philippe LEMANCEAU, Sylvie MAZURIER (2017).
- 2) Contribution of fluorescent pseudomonads to iron nutrition and health of pea. (2018-02-01) p60. [Tristan LURTHY](#), Laure AVOSCAN, Jean Paul LEMAITRE, Catherine BARRAUD, Philippe LEMANCEAU, Sylvie MAZURIER (2018).
- 3) Influence of pea genotype on root-associated pseudomonads, impact on the plant protection against fungal pathogens. (2018-06-27) p29. [Tristan LURTHY](#), Laure AVOSCAN, Jean Paul LEMAITRE, Catherine BARRAUD, Philippe LEMANCEAU, Sylvie MAZURIER (2018).
- 4-5) Interaction *Pisum sativum* (pois)- *Pseudomonas* : Conséquences sur la nutrition en fer, la croissance et l'immunité de la plante hôte (partie 2). [Tristan LURTHY](#), Laure AVOSCAN, Jean Paul LEMAITRE, Catherine BARRAUD, Philippe LEMANCEAU, Sylvie MAZURIER (2019).
- 6) Report on the interaction between pea and fluorescent pseudomonads and the potential impact on the plant iron nutrition. [Tristan LURTHY](#), Laure AVOSCAN, Jean Paul LEMAITRE, Catherine BARRAUD, Philippe LEMANCEAU, Sylvie MAZURIER (2019) awarded prized
- 7) Influence of pea genotype on root associated fluorescent pseudomonads, impact on plant iron nutrition. [Tristan LURTHY](#), Laure AVOSCAN, Jean Paul LEMAITRE, Catherine BARRAUD, Philippe LEMANCEAU, Sylvie MAZURIER (2019)
- 8) Influence du génotype de pois sur les *Pseudomonas* spp. fluorescents de la rhizosphère, impact sur la nutrition en fer de la plante. [Tristan LURTHY](#), Laure AVOSCAN, Jean Paul LEMAITRE, Cécile CANTAT, Catherine BARRAUD, Philippe LEMANCEAU, Sylvie MAZURIER (2019)



English level: TOEIC score 735 in 2012 and 7 months in Australia (2013)



Sport: crossfit, swimming



Travels: Indonesia, Australia, Thailand, Europe

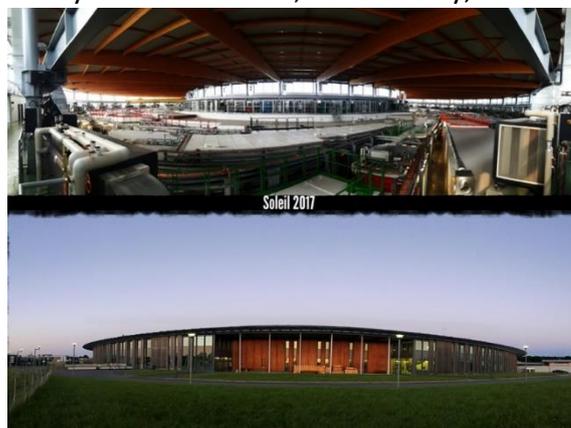
Annexes

Annexe 1 : Informations complémentaires relatives à la spectroscopie à rayons X

Principe de la spectroscopie d'absorption des rayons X d'après un extrait de la thèse de Laure Avoscan

La spectroscopie d'absorption des rayons X s'est développée à partir du milieu des années 1970 grâce au développement du rayonnement synchrotron, source multi-longueur d'onde (rayonnement blanc) et très brillante (très grand flux) de rayons X. Cette technique est basée sur l'effet photoélectrique résultant de l'interaction entre un photon X et la matière (**figure 2A chapitre IV**). Le coefficient d'absorption d'un élément décroît en fonction de l'énergie et présente des discontinuités brusques (seuils d'absorption). La position en énergie de ces seuils est liée à des transitions électroniques et est de ce fait caractéristique d'un élément donné. Les seuils K, L_I, L_{II}, L_{III}... correspondent aux transitions d'un niveau de cœur 1s, 2s, 2p vers un état vide situé au-dessus du niveau de Fermi. Cette transition électronique aboutit à l'émission d'un photoélectron. Quasi instantanément (temps caractéristique de l'ordre de 10^{-15} à 10^{-16} s), l'atome excité se relaxe avec la transition d'un électron d'une orbitale externe vers l'état excité d'énergie plus faible (orbitale interne), comblant ainsi la lacune créée. Cette relaxation conduit à l'émission soit d'un photon X dit « de fluorescence », soit d'un électron dit « Auger ». Les énergies de ces deux processus non-radiatifs ou radiatifs sont caractéristiques de chaque élément et permettent donc son identification. Dans notre cas, nous ne nous sommes intéressés qu'au processus de fluorescence. Pour que le processus d'absorption se produise, il faut que l'énergie du photon X soit supérieure ou égale à celle des premiers niveaux vides de l'atome, en dessous ou au-dessus du niveau de Fermi.

Photo des infrastructures du synchrotron Soleil, Paris-Saclay, France



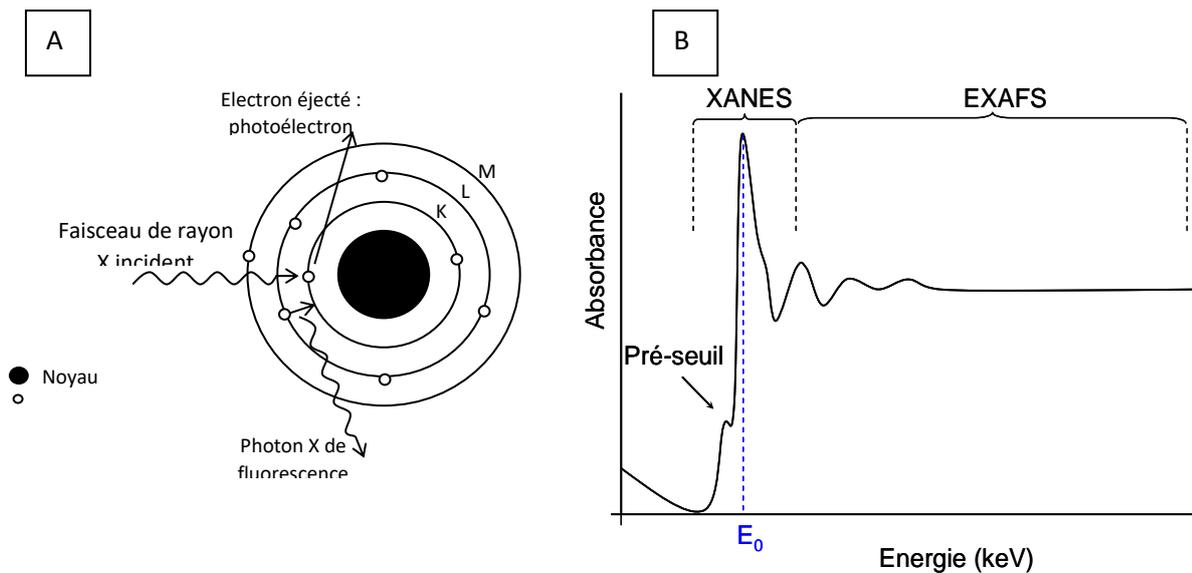


Figure 1 chapitre IV. Effet photoélectrique (A) et spectre d'absorption des rayons X obtenu (B) schématisés. Le signal d'absorption X (B) se déduit de la mesure du coefficient d'absorption des rayons X. Ce coefficient, noté μ , est une fonction de l'énergie E des rayons X incidents et se calcule à partir des intensités mesurées des faisceaux incident et transmis selon une loi de type Beer-Lambert : $I = I_0 e^{-\mu x}$.

x est l'épaisseur de l'échantillon

I₀ correspond à l'intensité du faisceau incident

Un spectre d'absorption X typique est montré en **figure 1B chapitre IV**. Sur ce spectre, on visualise les régions du pré-seuil, XANES et EXAFS, associées aux différents phénomènes physiques de l'électron excité.

Le pré-seuil correspond au domaine d'énergie du photon suffisant pour exciter un électron 1s de l'atome absorbeur mais restant cependant inférieur à l'énergie de seuil E_0 . Pour les métaux de transition comme le fer, la couche électronique 3d étant incomplète, des « pré-pics » peuvent être présents. Dans ce cas, l'analyse dans ce domaine apporte des informations sur le degré d'oxydation du fer : fer ferreux Fe^{2+} ou fer ferrique Fe^{3+} .

Le spectre XANES apporte des informations sur le degré d'oxydation de l'atome étudié (position du seuil...), sur la géométrie du site et sur le nombre de coordination de l'élément ainsi que sur la nature de ses voisins. Le spectre EXAFS permet d'obtenir des informations sur le proche voisinage de l'atome central : distance entre l'atome et ses voisins (R), nombre (N) et nature des voisins. Ainsi nous pouvons savoir si le fer dans la plante est toujours complexé à la pyoverdine.

Annexe 2 : Exemple de profils IEF

La 1ère et la dernière colonne correspondent au marqueur de taille constitué par des pyoverdines produites par des souches de références. Les échantillons de pyoverdine sont déposés au centre du gel et durant la migration, chaque pyoverdine va migrer sur le gel en fonction de son pHi (dépend de la structure de la chaîne peptidique et de la chaîne latérale la pyoverdine). A l'exception de la souche modèle C7R12, pour chaque colonne, le numéro correspond à une souche de *Pseudomonas* spp. fluorescents (basé sur les profils BOX-PCR) et la lettre correspond au profil IEF attribué. Par exemple, 2D et 3D sont deux souches taxonomiquement éloignées produisant une même pyoverdine de profil IEF D.

