



HAL
open science

Impact des génotypes de blé sur le métabolisme secondaire des *Pseudomonas* et conséquences sur leurs interactions avec la plante hôte

Laura Rieusset

► **To cite this version:**

Laura Rieusset. Impact des génotypes de blé sur le métabolisme secondaire des *Pseudomonas* et conséquences sur leurs interactions avec la plante hôte. Chimie analytique. Université de Lyon, 2020. Français. NNT : 2020LYSE1122 . tel-03587143

HAL Id: tel-03587143

<https://theses.hal.science/tel-03587143v1>

Submitted on 24 Feb 2022

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.

N°d'ordre NNT : xxx



THESE de DOCTORAT DE L'UNIVERSITE DE LYON
opérée au sein de
l'Université Claude Bernard Lyon 1

Ecole Doctorale N° 341
Evolution Ecosystème Microbiologie Modélisation

Ecologie microbienne
Chimie analytique

Soutenue publiquement le 10 juillet 2020, par :

Laura RIEUSSET

**Impact des génotypes de blé sur le métabolisme
secondaire des *Pseudomonas* et conséquences sur
leurs interactions avec la plante hôte**

Devant le jury composé de :

Monica HÖFTE, Professeure, Université de Gand

Rapporteur

Alain BOUCHEREAU, Professeur, Université Rennes 1

Rapporteur

Guilhem DESBROSSES, Professeur, Université de Montpellier

Rapporteur

Laurence FRAISSINET-TACHET, Professeure, Université Lyon 1

Examinatrice

Gilles COMTE, Professeur, Université Lyon 1

Directeur de thèse

Claire PRIGENT-COMBARET, Directrice de recherche, CNRS

Co-directrice de thèse

Université Claude Bernard – LYON 1

Président de l'Université	M. Frédéric FLEURY
Président du Conseil Académique	M. Hamda BEN HADID
Vice-Président du Conseil d'Administration	M. Didier REVEL
Vice-Président du Conseil des Etudes et de la Vie Universitaire	M. Philippe CHEVALLIER
Vice-Président de la Commission de Recherche	M. Jean-François MORNEX
Directeur Général des Services	M. Damien VERHAEGHE

COMPOSANTES SANTE

Faculté de Médecine Lyon-Est – Claude Bernard	Doyen : M. Gilles RODE
Faculté de Médecine et Maïeutique Lyon Sud Charles. Mérieux Doyenne :	Mme Carole BURILLON
UFR d'Odontologie	Doyenne : Mme Dominique SEUX
Institut des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques Directrice :	Mme Christine VINCIGUERRA
Institut des Sciences et Techniques de la Réadaptation Directeur :	M. Xavier PERROT
Département de Formation et Centre de Recherche en Biologie Humaine	Directrice : Mme Anne-Marie SCHOTT

COMPOSANTES & DEPARTEMENTS DE SCIENCES & TECHNOLOGIE

UFR Biosciences	Directrice : Mme Kathrin GIESELER
Département Génie Electrique et des Procédés (GEP)	Directrice : Mme Rosaria FERRIGNO
Département Informatique	Directeur : M. Behzad SHARIAT
Département Mécanique	Directeur M. Marc BUFFAT
UFR - Faculté des Sciences	Administrateur provisoire : M. Bruno ANDRIOLETTI
UFR (STAPS)	Directeur : M. Yannick VANPOULLE
Observatoire de Lyon	Directrice : Mme Isabelle DANIEL
Ecole Polytechnique Universitaire Lyon 1	Directeur : Emmanuel PERRIN
Ecole Supérieure de Chimie, Physique, Electronique (CPE Lyon)	Directeur : Gérard PIGNAULT
Institut Universitaire de Technologie de Lyon 1	Directeur : M. Christophe VITON
Institut de Science Financière et d'Assurances	Directeur : M. Nicolas LEBOISNE
ESPE Administrateur Provisoire :	M. Pierre CHAREYRON

Impact des génotypes de blé sur le métabolisme secondaire des *Pseudomonas* et conséquences sur leurs interactions avec la plante hôte

Résumé

Le sol adhérant aux racines des plantes abrite une communauté bactérienne importante et diversifiée. La plante libère, en effet, au niveau de ses racines, des exsudats qui vont sélectionner des bactéries capables de les utiliser. En retour, certaines bactéries sont capables d'entretenir des relations de coopération avec la plante, en stimulant sa croissance et en la protégeant contre des pathogènes. Ces bactéries phytobénéfiques dites PGPR (Plant Growth-Promoting Rhizobacteria) peuvent également interagir entre elles au sein de la communauté.

Le double objectif de ces travaux de thèse, a été de développer une approche métabolomique pour étudier l'impact du mode de vie et des interactions plante-bactéries sur la physiologie des organismes et mettre en évidence des médiateurs chimiques de l'interaction. Pour répondre à cet objectif, notre étude a été réalisée sur deux organismes modèles, le blé tendre (*Triticum aestivum* L.) et des souches bactériennes appartenant au groupe des *Pseudomonas* fluorescents.

Les travaux réalisés au cours de cette thèse ont permis une caractérisation de l'impact du mode de vie et des interactions sur la physiologie et l'expression des propriétés phytobénéfiques des *Pseudomonas*. Ils ont soulevé des points concrets à prendre en compte dans l'utilisation appliquée des PGPR en agriculture et ont également mis en évidence plusieurs médiateurs d'interactions entre la plante et les *Pseudomonas*. Ils forment un point de départ à de nombreuses perspectives à la fois pour définir l'activité biologique des médiateurs mis en évidence au cours de l'étude, mais également utiliser cette approche pour étudier d'autres interactions mettant en jeu d'autres organismes.

Mots clés : PGPR - génotypes de blé – métabolomique – biofilm - interaction plante / bactéries - métabolites secondaires.

Wheat root modulation of *Pseudomonas* secondary metabolism and in turn consequences on the host plant

The plant root adhering soil houses an important microbial community. Roots exude a wide variety of secondary metabolites able to attract and/or control a large diversity of microbial species. In return, among the root microbiota, some bacteria are able to promote plant development, using plant growth-promotion and plant protection properties. These bacteria are named PGPR for Plant Growth-Promoting Rhizobacteria. Some PGPR belong to the *Pseudomonas* genus. *Pseudomonas* are known to produce a wide diversity of secondary metabolites that could have biological activity on the host plant and other soil microorganisms. But yet, the impact of lifestyle and host plant on *Pseudomonas* secondary metabolism is still poorly understood.

The aim of our project is to better understand the impact of plant-bacteria interactions on organisms physiology and highlight chemical mediators of these interactions. For that, a metabolomic approach was developed in order to characterize plant-bacteria interactions between three wheat genotypes and five different fluorescent *Pseudomonas* strains.

Work realized during this thesis allowed to characterize the impact of bacterial lifestyle and plant-bacteria interactions on physiology and plant-beneficial properties of *Pseudomonas*. Our data highlight specific points that had to be considered for PGPR utilization in agriculture. They also allowed to identify chemical mediators of wheat-*Pseudomonas* interaction. They constitute a first step and lead to numerous perspectives in order to characterize biological activities of chemical mediators, but also use this approach to study the interaction between other organisms.

Key words: PGPR - wheat – métabolomics – biofilm – plant-bacteria interaction – secondary metabolites – signalling

Remerciements

Je tiens avant tout à remercier Monica Höfte, Alain Bouchereau et Guilhem Desbrosses qui ont accepté d'évaluer ces travaux de thèse ainsi que Laurence Fraissinet-Tachet qui s'est joint à eux pour le jury de soutenance.

Merci également au directeur de l'UMR CNRS 5557, Yvan Moëgne-Loccoz, pour m'avoir permis d'intégrer le laboratoire.

Je voulais aussi sincèrement remercier mes maitres de thèse Gilles Comte et Claire Prigent-Combaret pour leur soutien au cours de ces plus de 4 ans de travail ensemble d'abord en stage de M2, puis en thèse puis en ATER. Merci à tous les deux pour vos compétences respectives et vos conseils toujours bienveillants et pertinents.

Gilles, merci pour ton aide, pour m'avoir toujours soutenu et donné confiance en mon travail. Je retiendrais les réunions sur les chromatogrammes pour essayer de caractériser les molécules, tes conseils judicieux à la fois dans la mise au point des expérimentations, dans le traitement des données et dans la rédaction des papiers avec une mention spéciale à ton aide pour la rédaction en anglais...

Claire, J'ai vraiment beaucoup appris à tes côtés. Je te remercie pour ta rigueur, pour ton soutien et pour nos discussions scientifiques qui m'ont vraiment beaucoup apporté. Je retiendrais aussi les congrès où on est parti ensemble à Camaret, à Perpignan et surtout à Glasgow ! Merci encore pour ces moments.

Je remercie également les membres de mon comité de pilotage, Celine Lavire, Mohamed Bendahmane, Florence Piola et Soizic Prado pour leurs conseils avisés et l'aide qu'ils m'ont apportée dans la mise en œuvre de ce projet.

Je tiens également particulièrement à remercier Marjolaine Rey, déjà pour sa rigueur et ses compétences en chimie analytique et parce que sans elle je ne sais pas comment j'aurais réalisé ce travail. Merci Marjo, pour ton aide tout au long de cette thèse, dans les manipulations, le traitement de données et aussi pour les « mais ça va le faire » quand j'avais 200 (+/-45...) échantillons à passer au qTOF. Mais surtout merci pour ton soutien, pour les discussions et les rigolades, pour les randos en raquettes dans la Belledonne, les apéros et pour plein d'autres choses encore !

Je continue en remerciant tous les membres de l'équipe Rhizosphère, Florence Gerin pour son aide dans les manips, pour sa bonne humeur et pour les rigolades ! merci aussi à Daniel pour son aide sur les génomes bactériens, pour les enseignements d'ecoMic passés ensemble et pour ses blagues ... inimitables ! Merci aussi à Florence WD pour ses conseils sur l'étude du QS j'aurais aimé avoir plus de temps pour aller plus loin sur l'activité de ces fameux lipiN, merci aussi à Laurent, Benjamin, Juliana, Jeanne et Geneviève. Merci également de m'avoir aidé pour ma super récolte des blés, heureusement que vous étiez là !

Je remercie également tous les membres de la plateforme CESN avec qui j'ai pu travailler, Guillaume et Anne Emmanuelle pour vos conseils et pour les bons moments passés ensemble, mais aussi Serge, Isa, Laurence, Babeth, Marie Geneviève, Céline, Camille, Benjamin, Vincent et Laurent avec qui j'ai vraiment aimé travailler et partager des petits dejs les jeudis matin.

Je remercie aussi Corine parce que sans toi le labo ne serait pas pareil, parce que tu as toujours été arrangeante et prête à aider mais surtout parce que c'était cool de partager ton bureau pendant plus de deux ans et que nos discussions me manquent un peu. Merci aussi à Elise pour ton aide à la serre, pour avoir toujours trouvé de la place et à s'arranger quand on arrive tous avec nos xxx pots. Et puis aussi pour tes conseils botaniques et pour les pétunias ! Merci aussi à Danis pour ton aide sur R tu as toujours su répondre à mes questions, merci à toi. Merci aussi à Patricia pour ton aide dans les enseignements de cette année d'ATER.

Merci aussi à « mes » stagiaires : Bertille, Andrea et Joris qui m'ont aidé dans ces travaux et qui ont été supers. Merci à Andrea pour ta gentillesse et pour les bons moments passé ensemble aussi par la suite avec ton stage de M2.

Je remercie aussi tous les copains parce que sans eux ces quatre années au labo n'auraient pas été pareils ! Bien sur en premier les « meufs de Lisbonne » Elo, mon coach ! pour ces moments de rigolade dans le bureau, en soirée, en congrès et tout, mais surtout parce que, en vrai copine, tu étais toujours là pour me dire ce qu'il y avait au menu du domus aujourd'hui <3. Marine, parce que le café c'est sacré, que tes œuvres artistiques ont embelli ma paillasse pendant un bon moment et aussi parce que tu es toujours là pour danser sur de la Dub aux pots de thèses !! Solène, ma binôme de promos, on a commencé la thèse ensemble et on s'est soutenu tout du long, merci à toi. Et Bea aller là, c'est ton tour dans pas longtemps !!

aller hop hop hop sinon c'est salade tomate cerise sans sauce avec des tranches de magret pas cuites ! Merci les filles d'avoir été là parce que sans vous cette thèse ça n'aurait pas été la même.

Eh non je ne vous ai pas oublié ! Merci aussi à Jordan pour les rigolades en manip, en congrès et puis pour les soirées jeux, les soirées cocktails, les soirées jeux et cocktails (où tu gagnes tout le temps mais où les cocktails sont bons :p). Et William aussi, partenaire de bureau 418-i ! pour les rigolades, les parties de billard et pour nos enquêtes de Scherlock... Flo pour tes recettes inimitables et tes conseils d'ATER et n'oublie pas de venir chercher ton appareil à crêpe ! Jonath parce que tu n'es jamais le dernier pour boire un pastaga et faire un aviron bayonnais en soirée. Mais aussi Sam, Lucas, Xavier, Morgane, Thibault (pour notre super duo des accents en BV), Jordan Senior, Zazou, Julien, David (ça y est j'ai fini mon M2 !), Ben, Laura, Clémence, Quentin et Camille... et tous les nouveaux qui font durer la vie étudiante du labo, Florence, Mélanie, Théophile, Aline, Marine D, Zelia, Flavien et Cécile.

Je sors maintenant du labo, mais pas complètement encore, merci au copain du stage de M2, Chloé, Raph, Thibault, Melo, Baby, parce qu'on arrive encore à se voir un peu pour boire un verre sur les quais ou faire une rando dans la montagne. Bon là je sors vraiment du labo, merci d'abord aux copains de la ligue MPG, pour les restos du mois, pour les parties de tennis et surtout parce que la thèse c'est important, mais avoir gagné la demi-ligue du confinement ce n'est pas de la gnognote non plus !! Nin Nin Nin !! Merci aussi aux copains pharmaciens de Montpellier qui ont atterri à Lyon avec moi, Laura, Laurence et Arnaud, pour les bons moments passés ensemble.

Merci aussi à ma famille parce que ça fait maintenant 10 ans d'études et que vous m'avez toujours soutenu parce que « si les autres ils y arrivent il n'y a pas de raison que tu n'y arrives pas » Merci pour tout d'être toujours là !

Enfin un dernier merci à toi, Yann parce que ça fait maintenant presque 5 ans qu'on est arrivé à Lyon tous les deux, que tu m'as supporté pendant toute la durée de la thèse, même pendant les deux derniers mois de rédaction confinés dans un 50 m² et que sans toi cette thèse ça n'aurait pas été la même ! Ce paragraphe ne sera pas assez long pour te dire comme j'ai été heureuse de t'avoir à mes côtés, pour cette thèse et j'espère pour un moment encore !

<3

Table des matières

Introduction générale.....	1
Chapitre 1 : synthèse bibliographique	10
Introduction.....	11
Partie A : Les métabolites secondaires de blé impliqués dans les interactions avec les bactéries rhizosphériques	13
Généralités sur les métabolites secondaires du blé.....	14
Les acides hydroxycinnamiques	15
Les amides d'acides hydroxycinnamiques	17
Les flavonoïdes	21
Les benzoxazinoïdes.....	26
Partie B : Interactions de coopération dans le rhizomicrobiote et intérêt d'exploiter ces interactions dans le cadre d'une agriculture durable	40
Introduction.....	41
Social behavior in microbial communities	43
Chemical and non-chemical signaling involved in the control of microbial cooperation, phytostimulation, and biocontrol	47
Toward the commercial use of microbial consortia for biostimulation and biocontrol purposes.....	60
Conclusion	65
Chapitre 2 : Analyse métabolomique de l'impact du mode de vie des <i>Pseudomonas</i> sur la production de métabolites secondaires	78
Préambule	79
Abstract	81
Introduction.....	82
Results and discussion.....	84
Concluding remarks.....	97
Experimental procedures	98
Acknowledgments	104
References.....	105
Supplementary data	112
Chapitre 3 : Impact des métabolites racinaires de blé sur la physiologie des <i>Pseudomonas</i> rhizosphériques.....	117
Préambule	118
Partie A : Effet des métabolites racinaires de blé sur le métabolisme secondaire des <i>Pseudomonas</i>	120
Abstract	122

Introduction.....	123
Results	124
Discussion	135
Experimental procedures	142
Acknowledgments	146
References.....	147
Supplementary data.....	154
Partie B : Effet des métabolites racinaires sur la production de biofilm.....	163
Introduction.....	164
Matériel et méthode	165
Résultats	166
Discussion	168
Conclusion	169
Références.....	170
Chapitre 4 : Réponse métabolique du blé à l'inoculation de souches de <i>Pseudomonas</i> conditionnées et non conditionnées par des extraits racinaires.....	172
Préambule	173
Introduction.....	176
Matériel et méthode	179
Résultats	182
Discussion	196
Références.....	204
Données supplémentaires.....	208
Chapitre 5 : Discussion et perspectives.....	214
Perspectives.....	225
Conclusion générale	228
Références introduction générale et discussion générale	231

Liste de figures

Introduction générale

Figure 1 : Schéma récapitulatif de l'interaction entre la plante et le rhizomicrobiote.....4

Figure 2 : Diagramme représentant les différentes sciences « omiques » et leurs niveaux de caractérisation biologique.....5

Figure 3 : Répartition des souches de l'étude.....8

Chapitre 1 : Synthèse bibliographique

Partie A : Les métabolites secondaires de blé impliqués dans les interactions avec les bactéries rhizosphériques

Figure 1 : Vue synthétique du métabolisme des phénylpropanoïdes chez les végétaux. 16

Figure 2 : Exemple de structures chimiques d'amines aliphatiques et aromatiques pouvant entraîner la formation d'amides d'acide hydroxycinnamiques (HCAA)...18

Figure 3 : Schéma récapitulatif de l'implication des acide hydroxycinnamiques (HCA) et des amides d'acides hydroxycinnamiques (HCAA).....21

Figure 4 : Schéma récapitulatif de l'implication des flavonoïdes dans les interactions biotiques végétaux-microorganismes.....26

Figure 5 : Voie de biosynthèse des benzoxazinoïdes28

Figure 6 : Nomenclature des benzoxazinoïdes.....29

Figure 7 : Influence des benzoxazinoïdes sur le rhizomicrobiote.....33

Partie B : Interactions de coopération dans le rhizomicrobiote et intérêt d'exploiter ces interactions dans le cadre d'une agriculture durable

Figure 1 : Cooperation in the rhizosphere microbial community and role in host protection against disease and host growth stimulation.....45

Chapitre 2 : Analyse métabolomique de l'impact du mode de vie des *Pseudomonas* sur la production de métabolites secondaires

Figure 1 : Root colonization of *Pseudomonas* strains on wheat84

Figure 2 : Principal component analysis of LC–HRMS data obtained for the four *Pseudomonas* strains cultivated in planktonic (P) or in biofilm-colony (BC) conditions.....88

Figure 3 : Venn diagrams representing the percentage of secondary metabolites significantly and Heatmap clustering of the secondary metabolites.....90

Figure 4 : Molecular networks of MS/MS data obtained from biofilm cultures of the four bacterial strains.....92

Figure 5 : *Pseudomonas* strains produce a higher diversity of secondary metabolites in biofilm-colonies than in planktonic lifestyle.....98

Figure S1 : Tryptophan relative quantification in broth and agar un-inoculated medium.....115

Figure S2 : Chemical structures of some secondary metabolites from the studied plant-associated *Pseudomonas* strains.....116

Chapitre 3 : Impact des métabolites racinaires de blé sur la physiologie des *Pseudomonas* rhizosphériques

Partie A : Effet des métabolites racinaires sur le métabolisme secondaire des *Pseudomonas*

Figure 1 : Principal component analysis obtained from LC–HRMS profiles of root extracts of the three wheat genotypes (Adular (A), Bordeaux (B) and Soissons (S)).....126

Figure 2 : impact of wheat root extract on *Pseudomonas* secondary metabolism.....128

Figure 3 : Influence of wheat root extracts on *Pseudomonas* secondary metabolites involved in plant-bacteria or bacteria-bacteria interactions.....131

Figure 4 : Plant metabolites interfere with biosynthesis of phenazine.....133

Figure 5 : Plant metabolites interfere with biosynthesis of pyochelin.....134

Figure S1 : Effect of wheat root extracts on the growth of *Pseudomonas* strains.....154

Figure S2 : impact of wheat root extract on *Pseudomonas* secondary metabolism is concentration dependent.....155

Figure S3 : Enantio-pyochelin derivatives MS/MS fragmentation.....156

Partie B : Effet des métabolites racinaires sur la production de biofilm

Figure 1 : Impact des extraits racinaires des trois génotypes de blé sur la croissance et la production de biofilm chez cinq souches de *Pseudomonas*.....167

Chapitre 4 : Réponse métabolique du blé à l'inoculation de souches de *Pseudomonas* conditionnées et non conditionnées par des extraits racinaires

Figure S1 : Impact du conditionnement des souches JV395B et F113 par des extraits racinaires des génotypes Adular et Bordeaux sur leurs métabolismes secondaires respectifs.....175

Figure 1 : Schéma résumant le procédé expérimental utilisé pour le conditionnement et l'inoculation des souches conditionnées et non conditionnées178

Figure 2 : Impact des inoculations des souches JV395B et F113 (non conditionnées) sur le métabolisme secondaire racinaire des deux génotypes de blé Adular et Bordeaux183

Figure 3 : Impact de la souche JV395B conditionnée et non conditionnée sur le métabolisme secondaire racinaire du géotype Adular	186
Figure 4 : Impact de la souche F113 conditionnée et non conditionnée sur le métabolisme secondaire racinaire du géotype Adular.....	189
Figure 5 : Impact de la souche JV395B conditionnée et non conditionnée sur le métabolisme secondaire racinaire du géotype Bordeaux.....	191
Figure 6 : Réseau moléculaire obtenu après analyse MS/MS des extraits racinaires du géotype Adular inoculé et non inoculé,	195
Figure S2 : Quantification de la population bactérienne de chaque inoculum avant inoculation sur les graines des géotypes.....	208
Figure S3 : Impact de l'inoculation des souches F113 et JV395B conditionnée et non conditionnée sur la croissance des parties aériennes des géotypes Adular et Bordeaux	209
Figure S4 : Impact de l'inoculation des souches F113 et JV395B conditionnée et non conditionnée sur les biomasses sèches des racines et des feuilles des géotypes Adular et Bordeaux	210
Figure S5 : Analyse à composante principale (ACP) réalisée sur toutes les conditions de l'expérience.....	211
Chapitre 5 : Discussion et perspectives	
Figure 1 : Schéma récapitulatif des principales familles de métabolites bactériens dont la production est augmentée en mode biofilm.....	218
Figure 2 : Schéma récapitulatif des principaux médiateurs chimiques de l'interaction blé- <i>Pseudomonas</i> mis en évidence dans cette étude.....	221
Figure 3 : Impact d'une souche conditionnée et non conditionnée sur le métabolisme racinaire du blé.....	224

Liste des tableaux

Chapitre 1 : Synthèse bibliographique

Partie B : Interactions de coopération dans le rhizomicrobiote et intérêt d'exploiter ces interactions dans le cadre d'une agriculture durable

Table 1 : Example of microbial compounds implicated in biocontrol and microbial cooperation.....58

Chapitre 2 : Analyse métabolomique de l'impact du mode de vie des *Pseudomonas* sur la production de métabolites secondaires

Table 1 : Secondary metabolites and corresponding gene clusters of *Pseudomonas* strains..85

Table 2 : Chemical characterization of annotated secondary metabolites combined with heatmap representation of their differential production in planktonic or biofilm colony cultures.....95

Table S1 : Parameter settings used for metabolomics data processing.....112

Table S2 : Molecular networking: MZmine 2 data-preprocessing parameters.....113

Table S3 : List of 8 chemical standards used in UHPLC-DAD-qTOF analyses.....114

Chapitre 3 : Impact des métabolites racinaires de blé sur la physiologie des *Pseudomonas* rhizosphériques

Partie A : Effet des métabolites racinaires sur le métabolisme secondaire des *Pseudomonas*

Table S1 : Chemical characterization of annotated secondary metabolites combined with statistically significant differences between genotypes.....157

Table S2 : Parameter settings used for metabolomics data processing.....160

Table S3 : Molecular networking: MZmine 2 data-preprocessing parameters.....161

Table S4 : List of 15 chemical standards used in UHPLC-DAD-qTOF analyses.....162

Chapitre 4 : Réponse métabolique du blé à l'inoculation de souches de *Pseudomonas* conditionnées et non conditionnées par des extraits racinaires

Table S1 : Parameter settings used for metabolomics data processing of *Pseudomonas* extract and wheat root samples.....212

Table S2 : Molecular networking: MZmine 2 data-preprocessing parameters.....213

Introduction générale

Les micro-organismes vivent majoritairement au sein de communautés complexes et organisées dont le fonctionnement reste encore en grande partie inconnu (Stoodley et al. 2002). Ces communautés microbiennes peuvent être retrouvées dans tous les biotopes à la surface de la terre (Nadell et al. 2016). Elles peuvent également être associées à des organismes vivants et vivre en interaction avec un hôte. Dans ce cas la communauté constitue ce qu'on appelle un microbiote (Faure et al. 2018). La recherche actuelle montre tous les jours de nouvelles preuves de l'importance du microbiote dans la physiologie des organismes. La mise en évidence de ces phénomènes a conduit au concept d'holobionte qui désigne l'unité biologique entre un hôte et ses micro-organismes (Vandenkoornhuyse et al. 2015). Associée à ce concept d'holobionte, la notion d'hologénome évoque le fait qu'un organisme ne possède pas seulement les fonctions de son génome propre mais les fonctions de son génome et de ceux des micro-organismes qui lui sont associés, l'ensemble de ces génomes constitue l'hologénome (Rosenberg and Rosenberg 2016). Ces derniers concepts ont modifié les façons d'étudier les organismes dans le domaine de la biologie et montrent la nécessité de mieux comprendre les interactions entre un hôte et son microbiote. L'étude de ces interactions constitue un enjeu important dans plusieurs domaines tels que la santé ou l'agriculture.

Les plantes sont des producteurs primaires, c'est-à-dire qu'elles sont capables, via la photosynthèse, de produire de la matière organique à partir d'eau, d'air (CO₂) et de lumière (Sanchez et Demain 2019). Cette matière organique initialement composée de sucres, peut ensuite être transformée dans de multiples voies de biosynthèse pour aboutir à la production d'une très grande variété de molécules (Sanchez et Demain 2019). Ces molécules servent à la physiologie et au développement de la plante, mais ce sont également des médiateurs d'interaction et des sources de nourriture pour les organismes qui l'entourent (Bais et al. 2006). Une part importante des produits photosynthétiques est par exemple exsudée par les racines dans la rhizosphère (i.e. zone de sol sous influence des racines) (Sasse et al. 2018, **Figure 1**). La présence de toutes ces molécules dans la rhizosphère attire un grand nombre de micro-organismes présents dans le sol environnant pour former une communauté microbienne spécifique, le rhizomicrobiote (Sasse et al. 2018, **Figure 1**). La composition de ce rhizomicrobiote dépend des micro-organismes présents dans le sol mais également de la plante, qui par ses exsudats est capable de sélectionner certains taxa plutôt que d'autres (Bulgarelli et al. 2015). Ceci dit, les scientifiques considèrent maintenant qu'au-delà des taxa

particuliers, la plante sélectionne avant tout des fonctions microbiennes associées à ces taxa qui vont l'aider dans son développement (Lemanceau et al. 2017). Cette sélection se fait en grande partie via les molécules exsudées par les racines (Sasse et al. 2018, Figure 1). Certaines molécules (i.e. sucres, acide aminés...) sont des sources de nourriture et permettent ainsi de sélectionner les micro-organismes capables de les utiliser (Haichar et al. 2014). D'autres composés, ont des activités de signalisation et vont avoir un impact sur la physiologie des micro-organismes pour les attirer ou au contraire les repousser du rhizomicrobiote. Enfin des composés antimicrobiens peuvent également inhiber la croissance de certains micro-organismes (Lebeis et al. 2015, Hu et al. 2018, Stringlis et al. 2018). Le rhizomicrobiote joue alors un rôle fondamental dans le développement de la plante (Venturi and Keel 2016, Figure 1). On peut par exemple trouver des PGPR (i.e. *Plant Growth Promoting Rhizobacteria*) qui présentent des fonctions phytobénéfiques et promeuvent la santé de la plante (Vacheron et al. 2013). Parmi ces PGPR, certaines bactéries favorisent plutôt la croissance de la plante via des fonctions dites phytostimulatrices telles que la fixation de l'azote, la solubilisation du phosphate ou encore la production de phytohormones (Drogué et al. 2012). D'autres ont plutôt une activité phytoprotectrice et protègent la plante contre des attaques de pathogènes via trois mécanismes principaux : la compétition contre les autres organismes, la production de composés antimicrobiens qui inhibent la croissance des pathogènes, ou encore l'induction de la résistance systémique de la plante (ISR) (Vacheron et al. 2013).

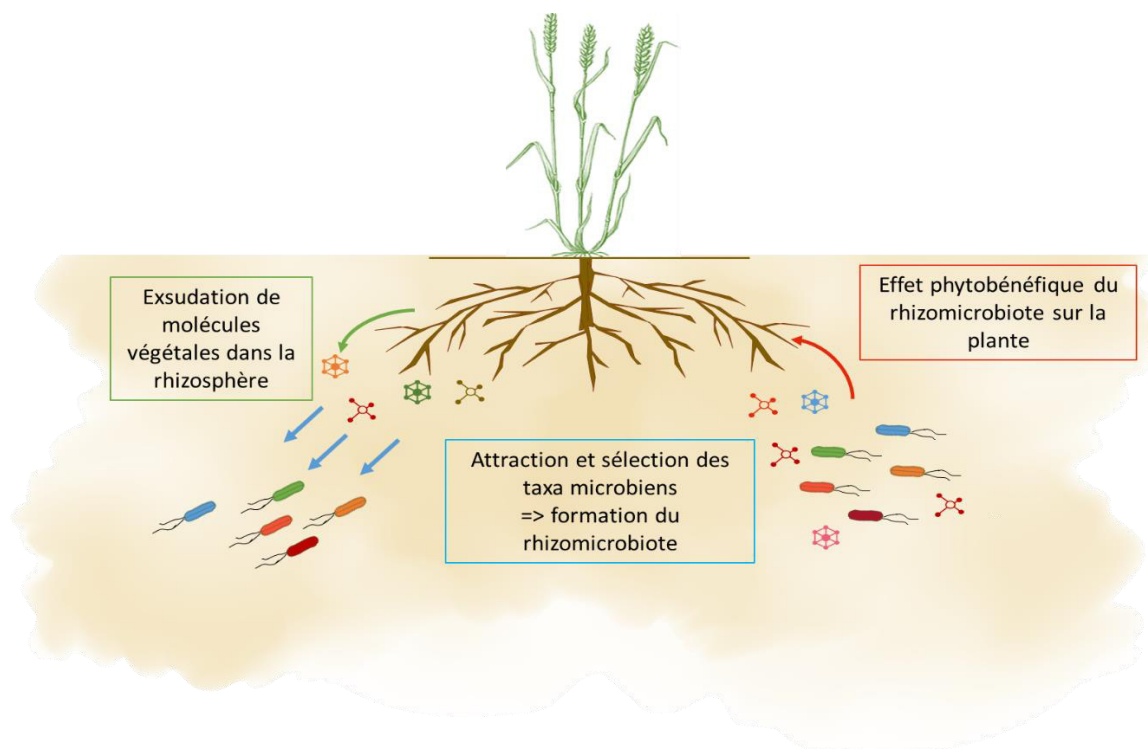


Figure 1 : Schéma récapitulatif de l'interaction entre la plante et le rhizomicrobiote. La plante exsude des métabolites racinaires qui attirent et sélectionnent un grand nombre de taxa microbiens pour former le rhizomicrobiote. En retour le rhizomicrobiote peut favoriser le développement de la plante et la protéger contre des attaques de pathogènes, notamment via la production de molécules bioactives.

A l'heure actuelle où l'utilisation de produits phytosanitaires est de plus en plus controversée et tend à faire l'objet de contrôle et de limitations, l'utilisation de stratégies de biocontrôle et notamment des PGPR apparaît comme une alternative prometteuse (Perez-Montaño et al. 2014). Mais pour une utilisation efficace et raisonnée de ces organismes, il faut connaître leurs modes de vie et comprendre les interactions qu'elles entretiennent avec leur plante hôte. L'effet des PGPR sur la plante a fait l'objet de nombreuses études et certains organismes sont même déjà commercialisés pour une utilisation en agriculture (Perez-Montaño et al. 2014, Vacheron et al. 2013). Par ailleurs, plusieurs études scientifiques se sont également intéressées à l'impact de la plante hôte sur la composition et la structure de son rhizomicrobiote et sur la présence de fonctions génétiques phytobénéfiques (Philippot et al. 2013, Lemanceau et al. 2017, Vacheron et al. 2016). Néanmoins, encore peu d'études se sont intéressées à l'impact de la plante hôte et du mode de vie des PGPR sur la production des métabolites secondaires impliqués dans l'activité phytobénéfique des souches. L'étude des métabolites primaires et secondaires produits par un organisme dans un environnement donné

est l'objectif de la dernière-née des sciences « omiques », la métabolomique (Wolfender et al. 2015, Figure 2). Cette méthodologie permet de répondre à des questions biologiques en faisant appel à des techniques de chimie analytique, de statistique et de bio-informatique. Elle permet par l'étude des métabolites, de prendre en considération les facteurs environnementaux biotiques comme abiotiques qui peuvent avoir un impact sur l'expression des gènes codant les fonctions phyto-bénéfiques (Favre et al. 2018, Figure 2).

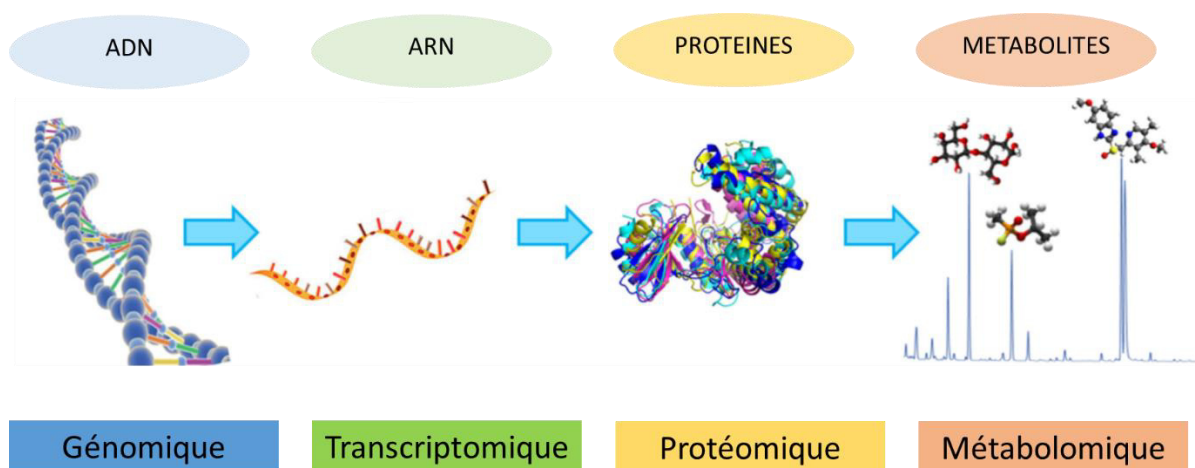


Figure 2 : Diagramme représentant les différentes sciences « omiques » et leurs niveaux de caractérisation biologique. Figure modifiée à partir de Gonzalez-Riano et al. 2016.

Dans ce contexte, le double objectif global de ces travaux de thèse, a été de développer une approche métabolomique pour étudier l'impact du mode de vie et des interactions plante-bactéries sur la physiologie des organismes et mettre en évidence des médiateurs chimiques de l'interaction. Pour répondre à cet objectif, notre étude a été réalisée sur deux organismes modèles, le blé tendre (*Triticum aestivum* L.) et des souches bactériennes appartenant au groupe des *Pseudomonas* fluorescents.

Le blé est une monocotylédone qui appartient à la famille de *Poaceae* au même titre que le riz ou le maïs. Il représente une des cultures les plus importantes sur la planète et a fait l'objet d'une sélection variétale importante qui a conduit à l'apparition de plus d'un millier de variétés différentes (Roussel et al. 2005). On différencie le blé tendre (*Triticum aestivum* L.) du blé dur (*Triticum durum* L.). Le blé dur qui nécessite un climat sec et chaud, est plutôt cultivé dans le sud de l'Europe et produit des grains principalement utilisés pour la confection de pâtes

sèches. Le blé tendre est, en revanche, majoritairement cultivé dans le nord et l'est de l'Europe, et produit un grain plus farineux que le blé dur. Il constitue la première céréale produite en France, essentiellement pour la production de farine panifiable. L'évaluation des capacités nutritionnelles et de la composition métabolique des grains de blé a mis en évidence des différences qualitatives et quantitatives entre les différents génotypes (Dinelli et al. 2011, Beleggia et al. 2013, Gotti et al. 2018). Le blé est capable d'interagir avec de nombreuses PGPR à la fois phytoprotectrices et phytostimulatrices (Sanguin et al. 2009, Mavrodi et al. 2018). L'importance de l'interaction blé-PGPR peut également être différente en fonction des différents génotypes de blé suggérant des productions de métabolites racinaires différentes (Valente et al. 2020). Mais si le métabolisme secondaire des graines est relativement bien connu, celui des racines reste encore mal caractérisé (Wu et al. 2001). Une première partie du travail bibliographique de cette thèse a donc été de déterminer les familles de métabolites secondaires présentes au niveau des racines de blé et potentiellement impliquées dans ses interactions avec les bactéries rhizosphériques. Compte tenu des divergences de composition métabolique et d'interaction entre les différents génotypes de blé, nous avons choisi d'inclure dans notre étude trois génotypes différents Adular 797, Bordeaux 13 7973 et Soissons 6607 (GEDEC, Clermont-Ferrand).

Le blé interagit avec une communauté complexe le rhizomicrobiote. Cette communauté est composée d'une grande diversité de micro-organisme qui interagissent à la fois entre eux et avec la plante. Une deuxième partie du travail bibliographique de cette thèse présente les différentes interactions qui peuvent intervenir au sein du rhizomicrobiote. Elle définit les différents métabolites secondaires médiateurs de ces interactions et l'importance de prendre en compte la coopération bactérienne dans le développement d'inocula destinés à une utilisation en agriculture. Néanmoins la complexité des interactions dans la communauté rend son étude extrêmement difficile. Notre étude visant à étudier le métabolisme secondaire à la fois du blé et des PGPR en interaction a donc été réalisée sur des organismes modèles. Les modèles bactériens utilisés dans cette étude correspondent à cinq souches appartenant au groupe des *Pseudomonas* fluorescents. Les *Pseudomonas* sont des bactéries ubiquistes du fait de leur capacité à consommer rapidement un grand nombre de sources de carbone (Weller et al. 2007). Les *Pseudomonas* du groupe des *Pseudomonas* fluorescents sont majoritairement

retrouvés dans le sol, et plus particulièrement dans la rhizosphère de nombreuses plantes (Vacheron et al. 2016). Un grand nombre d'entre eux possède des fonctions phytobénéfiques qui vont aider au développement de la plante (Weller et al. 2007). Ils sont capables de stimuler la croissance de la plante via la production de phytohormones telles que l'auxine ou encore l'augmentation de la biodisponibilité de certains nutriments tels que le fer ou phosphate (Vacheron et al. 2013). Ce sont également des bactéries très compétitives qui peuvent coloniser rapidement la rhizosphère et inhiber la croissance d'autres micro-organismes et particulièrement des pathogènes (Raaijmakers et al. 2010). Enfin, les *Pseudomonas* sont parmi les genres bactériens capables de produire la plus grande diversité de molécules actives (Gross and Loper 2009). La production de ces composés de fonctions biologiques variées (i.e. sidérophores, antimicrobiens, signalisation...) est d'une importance majeure dans leurs interactions avec la plante et avec les autres membres de la communauté microbienne (Deveau et al. 2016, Combes-Meynet et al. 2011, Price-Whelan et al. 2006). Le groupe des *Pseudomonas* fluorescents comprend plusieurs espèces qui présentent des fonctions phytobénéfiques différentes. Récemment les travaux de Vacheron et al. réalisés dans notre équipe ont permis de différencier les espèces appartenant au clade CPC (*P. chlororaphis*, *P. protegens*, *P. corrugata*) présentant le plus de fonctions phytobénéfiques, du clade FMJK (*P. fluorescens*, *P. mandelii*, *P. jessenii*, *P. koreensis*) présentant moins de fonctions phytobénéfiques (Vacheron et al. 2016, **Figure 3**). Les souches intégrées dans notre étude sont les souches *P. kilonensis* F113, *P. protegens* CHA0, *P. chlororaphis* JV395B et *P. chlororaphis* JV497 appartenant au clade CPC ; et la souche *P. koreensis* JV222 appartenant au clade FMJK (**Figure 3**).

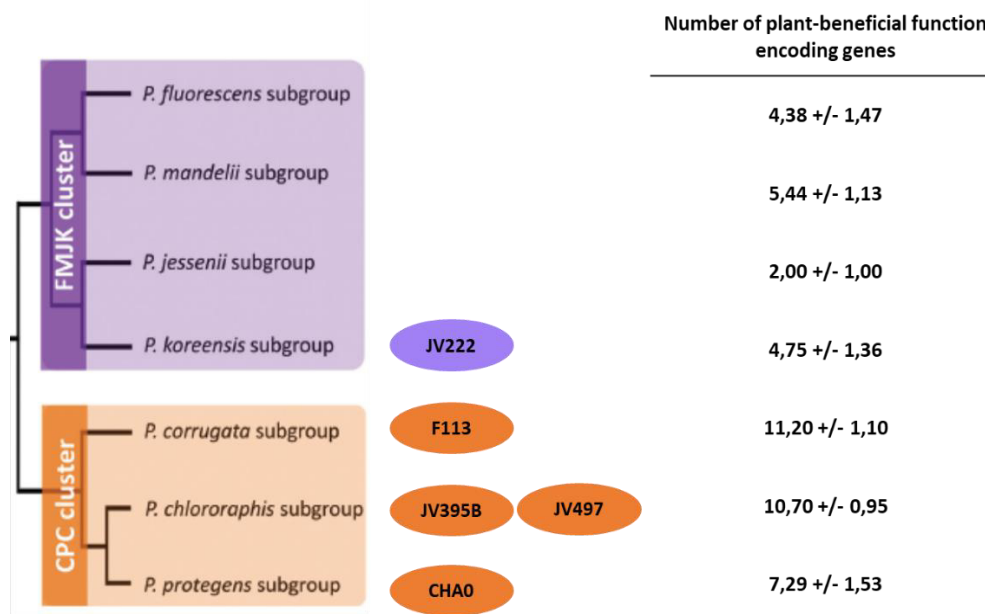


Figure 3 : Répartition des souches de l'étude *P. kilonensis* F113, *P. protegens* CHA0, *P. chlororaphis* JV395B, *P. chlororaphis* JV497 et *P. koreensis* JV222 au sein des différents clades compris dans le groupe des *Pseudomonas* fluorescents (A). Nombres moyen de fonctions phyto-bénéfiques le plus fréquemment détecté dans les différents sous-groupes (B). Figure modifiée à partir de Vacheron et al. 2016.

Ainsi les objectifs qui ont structuré ce projet de thèse étaient au nombre de trois :

Le premier objectif de ce travail était de caractériser le métabolisme secondaire de quatre souches de *Pseudomonas* intégrées dans l'étude. Le séquençage des génomes associé à la recherche des gènes impliqués dans la production de métabolites secondaires nous a permis dans un premier temps d'évaluer les capacités métaboliques des souches. Nous avons ensuite extrait et analysé les métabolites secondaires produits par chacune des souches en mode biofilm et en mode planctonique. Le mode biofilm est très important dans la rhizosphère et souvent relié à la notion de colonisation racinaire. Cette comparaison avait pour objectif de mettre en évidence les métabolites différentiels entre le mode biofilm et le mode planctonique et mettre en évidence l'impact du mode de vie sur l'expression des capacités phyto-bénéfiques des souches.

Le deuxième objectif était d'évaluer l'impact des métabolites racinaires de blé sur la physiologie et le métabolisme secondaire de cinq souches de *Pseudomonas*. Après avoir caractérisé les métabolites secondaires racinaires, des 3 génotypes de blé, les extraits correspondants ont ensuite été mis en contact de chacune des souches de *Pseudomonas* à très faible concentration dans le but de modéliser des interactions de signalisation entre la plante

et les bactéries. Nous avons ensuite extrait et analysé les métabolites produits par chacune des souches en présence et en absence des extraits racinaires dans le but d'évaluer l'impact des métabolites racinaires sur l'expression du métabolisme secondaire des *Pseudomonas* et par voie de conséquence sur leurs capacités phytobénéfiques.

Enfin, le dernier objectif de ces travaux de thèse a été d'évaluer si les souches de *Pseudomonas* dont le métabolisme a été modifié par les extraits racinaires avaient un impact différent sur le blé. Pour répondre à cet objectif, nous avons inoculé les souches *P. kilonensis* F113 et *P. chlororaphis* JV395B conditionnées et non conditionnées par des extraits racinaires sur les graines des génotypes Adular et Bordeaux en sol non stérile. Le premier intérêt de cette expérimentation était de déterminer la réponse métabolique de chacun des deux génotypes de blé à l'inoculation des *Pseudomonas* et éventuellement de mettre en évidence une spécificité d'interaction génotype - souche. Le deuxième intérêt, était d'évaluer si l'inoculation des souches conditionnées entraînait une réponse métabolique différente de celle induite par les souches non conditionnées.

Ainsi dans ce manuscrit, nous aborderons tout d'abord une synthèse bibliographique qui, présentera dans un premier temps les métabolites secondaires de blé pouvant être impliqués dans les interactions avec le rhizomicrobiote. Puis, dans un second temps, l'importance des coopérations microbiennes au sein du rhizomicrobiote avec un focus sur les métabolites secondaires bactériens impliqués à la fois dans les interactions bactérie-bactérie et bactérie-plante (Chapitre 1). Un deuxième chapitre présentera ensuite des travaux évaluant la production de métabolites secondaires chez les souches de *Pseudomonas* rhizosphériques en mode biofilm et en mode planctonique (Chapitre 2). Nous verrons ensuite l'impact des métabolites racinaires de blé sur le métabolisme secondaire et la physiologie des *Pseudomonas* (Chapitre 3). Enfin une dernière partie portera sur la réponse métabolique du blé à l'inoculation de souches de *Pseudomonas* conditionnées et non conditionnées par les extraits racinaires (Chapitre 4). L'ensemble des résultats sera alors discuté et replacé dans le contexte global afin de pouvoir tirer les conclusions et les perspectives de ces travaux (Chapitre 5).

Chapitre 1 : Synthèse bibliographique

Introduction

Tous les organismes sont soumis à des interactions avec leur environnement. Ces interactions peuvent soumettre l'organisme à des variables physiques ou facteurs abiotiques tels que la sécheresse, la température ou encore les rayonnements ultra-violet (UV) (Hausler *et al.* 2014). D'autres types d'interaction mettent en relation différents organismes, on parle cette fois d'interaction biotique (Phelan *et al.* 2011). Elles peuvent être à la fois positives ou négatives, et impliquer différents moyens de communication (i.e. échange de signaux chimiques, partage de voies métaboliques, échanges génétiques ou encore contact direct) (Phelan *et al.* 2011).

Les interactions biotiques positives ont un effet bénéfique sur au moins un des deux partenaires sans être délétères pour l'autre (Sach *et al.* 2004). On différencie l'interaction mutualiste qui est de nature spécifique et obligatoire (Perez-montano *et al.* 2011) de l'interaction de coopération, facultative et non spécifique (Sach *et al.* 2004). Depuis quelques temps, on parle même, au sein des communautés microbiennes, d'interaction altruiste mettant en jeu un organisme capable de produire des éléments nécessaires aux autres membres de la communauté microbienne (Nadell *et al.* 2016).

Les interactions biotiques négatives peuvent, elles, être de quatre natures différentes : la compétition, l'antagonisme, le parasitisme et la prédation. L'interaction de compétition intervient lorsque plusieurs individus utilisent un même habitat ou une même ressource (Bakker *et al.* 2014). Les souches de *Pseudomonas* capables d'utiliser rapidement plusieurs sources de carbone sont par exemple des bactéries versatiles, particulièrement compétitives dans la rhizosphère (Vacheron *et al.* 2016). On parlera plutôt d'antagonisme lorsque l'interaction négative met en jeu la production d'une molécule capable d'inhiber la croissance d'un autre organisme (Bollenbach 2015). Au sein du rhizomicrobiote, les bactéries produisent par exemple des composés antimicrobiens capables d'inhiber la croissance d'autres micro-organismes (Venturi and Keel 2016). Enfin, les derniers types d'interactions négatives sont la prédation et le parasitisme. On parlera de prédation lorsqu'un des partenaires utilise l'autre comme une source immédiate de nourriture, et de parasitisme quand l'interaction est plus durable et où un des partenaires vit au dépend de l'autre durant une période donnée (Bertrand *et al.* 2011).

Les interactions biotiques ou abiotiques font partie intégrante de l'évolution d'un organisme dans son environnement et sont médiées par une très grande diversité de molécules (Venturi and Keel 2016). Les organismes vivants sont capables de produire à la fois des métabolites primaires et des métabolites secondaires. Les métabolites primaires sont indispensables à la vie ; ils sont intégrés dans le métabolisme basal et interviennent dans les relations trophiques (Haichar *et al.* 2014). Les métabolites secondaires représentent une plus grande diversité de structures et de fonctions biologiques et sont impliqués dans l'adaptation d'un organisme dans son environnement (Moco *et al.* 2007). L'association des métabolites primaires et des métabolites secondaires constitue le métabolome d'un organisme (Wolfender *et al.* 2015). Il est néanmoins important de noter que la définition de ces deux métabolismes est de plus en plus remise en question (Wolfender *et al.* 2015). En effet, la frontière entre le métabolisme primaire et le métabolisme secondaire peut parfois être très mince, certains métabolites dit primaires peuvent par exemple avoir un effet de signalisation important (Häusler *et al.* 2014), à l'inverse certains métabolites dit secondaires peuvent être catabolisés par certains micro-organismes pour servir de source de carbone (Neal *et al.* 2012).

L'objectif de ce travail bibliographique sera de définir les métabolites secondaires végétaux et bactériens impliqués dans les interactions biotiques entre une plante hôte et son rhizomicrobiote. Une première partie de ce travail définira le métabolisme secondaire du blé et présentera les principales familles de métabolites secondaires pouvant être impliqués dans les interactions avec le rhizomicrobiote. Une deuxième partie portera sur la notion de coopération au sein du rhizomicrobiote et sur les intérêts que peut avoir l'application de cette coopération au sein des agrosystèmes. Dans cette seconde partie seront notamment présentés les différents métabolites secondaires bactériens impliqués, à la fois, dans les interactions des bactéries entre elles et avec la plante hôte avec un focus sur les *Pseudomonas*. Cette 2^e partie a fait l'objet d'une revue publiée dans le journal *Environmental Science and Pollution Research* en 2017.

Partie A : Les métabolites
secondaires de blé impliqués dans
les interactions avec les bactéries
rhizosphériques

Généralités sur les métabolites secondaires du blé

Du fait de leur immobilité, les plantes ont dû développer des stratégies pour s'adapter à leur environnement. Une d'entre elles est la production de métabolites secondaires donnant lieu à plus de 100 000 structures chimiques différentes présentant des fonctions biologiques spécifiques (Wolfender *et al.* 2015, Moco *et al.* 2007). Les métabolites secondaires végétaux sont généralement regroupés en trois grandes familles principales : les terpènes, les alcaloïdes et les dérivés de composés phénoliques dont les voies sont interconnectées les unes avec les autres (Sanchez and Demain 2019). Contrairement aux métabolites primaires ubiquitaires entre les êtres vivants, les métabolites secondaires peuvent être spécifiques d'une espèce voire même d'un génotype de plante (Raguso *et al.* 2015, Walker *et al.* 2011).

Le blé est une herbacée de la famille des *Poaceae* ; il représente une des plus grandes cultures sur la planète (Valente *et al.* 2020). Du fait de l'importance des grains de blé pour une utilisation agroalimentaire, la très grande majorité des études phytochimiques ont été réalisées sur les graines de blé. Ces études ont pu montrer une spécificité du métabolisme secondaire entre les différents génotypes de blé déjà au niveau de la graine (Dinelli *et al.* 2011, Gotti *et al.* 2018, Starr *et al.* 2015), montrant également la présence dans le grain de plusieurs familles de métabolites secondaires tels que des dérivés de composés phénoliques comme les flavonoïdes ou les acides hydroxycinnamiques (Dinelli *et al.* 2011, Gotti *et al.* 2018). La composition métabolique des racines de blé est beaucoup moins bien décrite que celle des graines. Plusieurs familles de composés courants dans le règne végétal peuvent néanmoins être présents dans les racines tels que les dérivés de composés phénoliques, les terpènes ou les dérivés d'acides gras (Jin *et al.* 2003, Monreal and Schnitzer 2013), ainsi que des métabolites plus spécialisés tels que les benzoxazinoïdes qui sont produits principalement chez les *Poaceae* (Wouters *et al.* 2016). Dans ce travail nous allons principalement nous focaliser sur les familles de composés détectées dans les extraits utilisés dans notre étude et décrites pour jouer un rôle important dans les interactions rhizosphériques du blé (Wu *et al.* 2001) à savoir les acides hydroxycinnamiques (HCA), les amides d'acides hydroxycinnamiques (HCAA), les flavonoïdes et les benzoxazinoïdes.

Les acides hydroxycinnamiques

1. Généralités et biosynthèse

Les acides hydroxycinnamiques (HCA) sont des composés très courants dans le monde végétal où ils sont produits dans des proportions importantes (Wu *et al.* 2001). Ils sont issus du métabolisme du phénylpropanoïdes dont le précurseur est la phénylalanine qui peut être produite par la voie du shikimate (Figure 1, El-Seedi *et al.* 2012). La phénylalanine peut ensuite être désaminée par la phénylalanine ammonia lyase (PAL) pour donner l'acide cinnamique et par la suite d'autres dérivés tels que les acides coumariques, caféiques, sinapiques ou féruliques (Figure 1). Les HCA font office de précurseurs pour la production de nombreuses molécules phénoliques telles que les flavonoïdes, les coumarines, les chalcones, les anthocyanes ou encore les HCAA (Figure 1). Les dérivés hydroxycinnamyl alcool (i.e. *p*-coumaryl, coniferyl, et sinapyl alcool) sont également les monomères dont la polymérisation permet la formation de la lignine qui compose certaines parois végétales (Figure 1, Vanholme *et al.* 2019).

En plus d'être à la base de plusieurs voies de biosynthèse donnant lieu à des métabolites bioactifs, les HCA ont un rôle dans la croissance et le développement de la plante (Vanholme *et al.* 2019b). L'acide *cis*-cinnamique - issu majoritairement d'une isomérisation de l'acide *trans*-cinnamique via la lumière UV – à faible concentration pourrait, par exemple, interférer avec le transport de l'auxine et induire une augmentation de la croissance des racines latérales chez les jeunes plantes (Vanholme *et al.* 2019b). En revanche, à forte concentration l'acide *cis*-cinnamique peut également avoir un effet herbicide (Masato *et al.* 2012). Néanmoins, du fait de leur position centrale dans le métabolisme végétal, il est extrêmement difficile de construire des mutants sur la voie des HCA sans altérer d'autres voies métaboliques. Cette limite, associée à des différences d'activité en fonction de la concentration des molécules rend difficile l'étude de l'activité biologique des HCA dans la physiologie de la plante (Vanholme *et al.* 2019b).

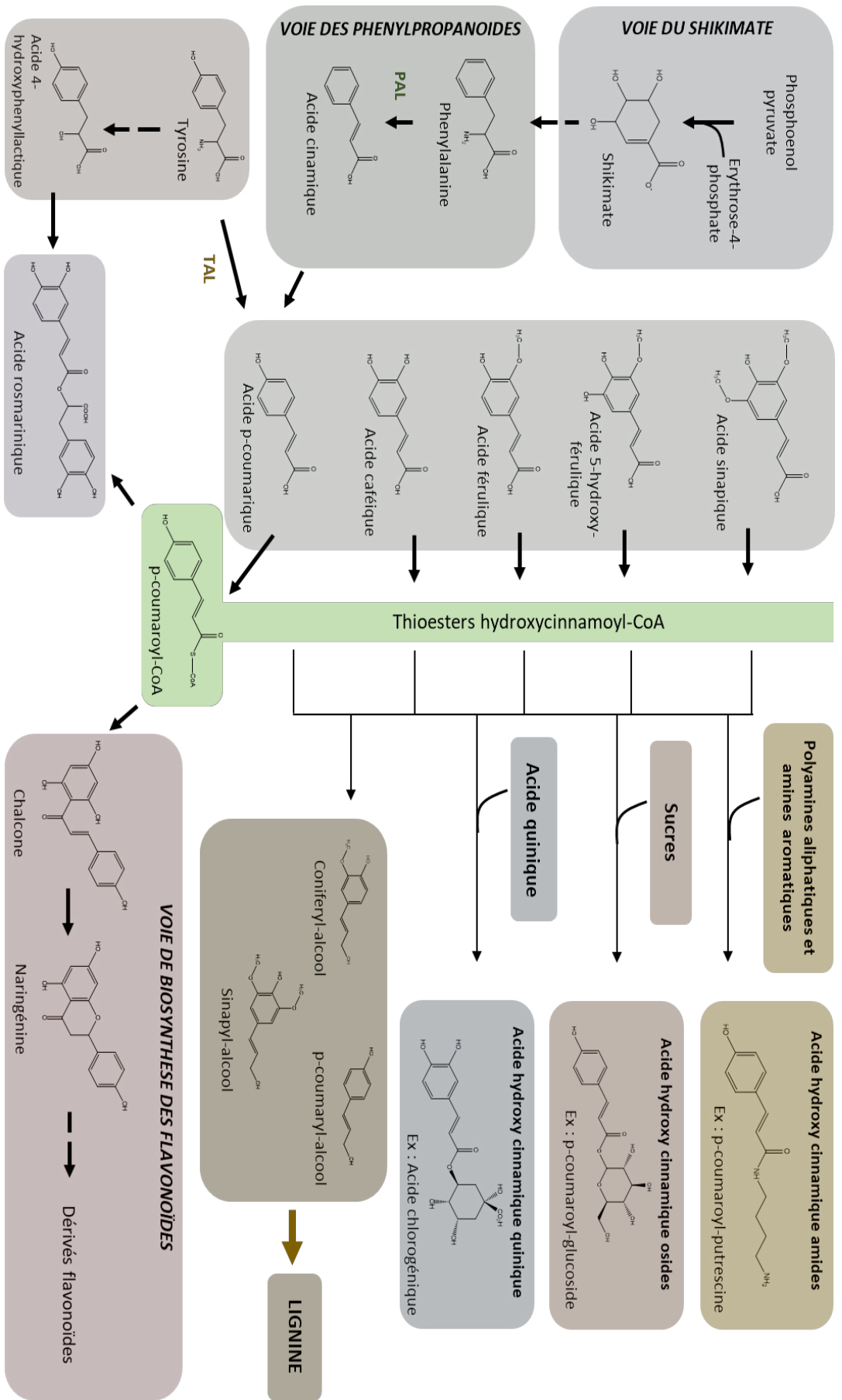


Figure 1 : Vue synthétique du métabolisme des phénylpropanoïdes chez les végétaux. PAL : phénylalanine-ammonia-lyase ; TAL : Tyrosine-ammonia-lyase

2. Implication dans les interactions avec les bactéries rhizosphériques (Figure 3)

Les HCA peuvent être exsudés par les racines dans différentes proportions en fonction du génotype du blé et de la molécule (Wu *et al.* 2001). Chez le blé, les dérivés détectés en plus grande quantité sont l'acide *p*-coumarique et l'acide férulique (Wu *et al.* 2001). Leur exsudation au niveau des racines suggère une activité biologique dans les interactions rhizosphériques (Figure 3). L'acide *p*-coumarique est par exemple capable d'inhiber le quorum sensing (QS) chez plusieurs souches de *Pseudomonas* rhizosphériques (Figure 3, Bodini *et al.* 2009). Le QS est un mécanisme qui permet aux bactéries de communiquer entre elles par le biais de médiateurs chimiques particuliers tels que les acyl-homosérine-lactones (AHLs) (Flemming *et al.* 2016). Il permet aux bactéries d'estimer leur population et ainsi de réguler plusieurs fonctions bactériennes telles que la colonisation racinaire, la production de biofilm, ou encore la production de composés antimicrobiens (Price-Whelan *et al.* 2006, Flemming *et al.* 2016 ; ce phénomène est expliqué plus en détail dans la 2^e partie de ce travail bibliographique). Chez *Pseudomonas chlororaphis*, cette inhibition du QS est, par exemple, également accompagnée de la diminution de composés antimicrobiens régulés par le QS (Bodini *et al.* 2009). A l'inverse, l'acide rosmarinique agit plutôt comme un agoniste sur les récepteurs QS chez *Pseudomonas aeruginosa* PA01 et induit une augmentation de l'expression des gènes régulés par le QS (Corral-Lugo *et al.* 2016, Fernández *et al.* 2018). Plusieurs HCA peuvent également être dégradés et utilisés comme source de carbone par plusieurs bactéries rhizosphériques telles que *Pseudomonas putida* ou *Agrobacterium fabrum* C58 (Plaggenborg *et al.* 2003, Meyer *et al.* 2018).

Les amides d'acides hydroxycinnamiques

1. Généralités et biosynthèse

Les amides d'acides hydroxycinnamiques (HCAA) représentent une des principales classes de métabolites dérivés du métabolisme de phénylpropanoïdes (Macoy *et al.* 2015). Ils sont issus de la condensation entre un HCA et une polyamine aliphatique (i.e. spermidine, putrescine, agmatine, cadaverine...) ou aromatique (i.e. dopamine, tyramine, tryptamine, noradrénaline...)

(Figure 1 et 2). Ils sont également décrits sous les termes de phénylamides ou phénolamides (Bassard *et al.* 2010). Les HCAA sont impliqués dans plusieurs phénomènes physiologiques tels que la floraison ou la défense de la plante (Martin-Tanguy *et al.* 1985). Leur présence a été détectée dans tous les organes végétaux et dans les graines de plusieurs monocotylédones tels que le maïs ou le riz (Martin-Tanguy *et al.* 1985, Bassard *et al.* 2010). Certains dérivés tels que la féruloyl-tyramine ou la féruloyl-octopamine semblent même être des constituants de la subérine, un biopolymère déposé au niveau de la paroi des cellules de plusieurs tissus dont le périoderme des racines (Garça *et al.* 2015, Delude *et al.* 2016). Leur présence dans la subérine entraîne une augmentation de l'épaisseur de la paroi végétale et limite la diffusion des pathogènes via des activités antimicrobiennes (Macoy *et al.* 2015). Ils jouent un rôle important dans la résistance des végétaux et leur production peut être augmentée en réponse à un stress biotique ou abiotique (Jin *et al.* 2003, Macoy *et al.* 2015, Häusler *et al.* 2014). La p-coumaroyl- agmatine et la p-coumaroyl-3-hydroxyagmatine ont par exemple leur production augmentée au niveau des racines de blé en réponse au froid (Jin *et al.* 2003). L'activité antifongique de ces composés suggère qu'ils soient impliqués dans une double protection du blé à la fois contre le froid et les attaques de champignons (Jin *et al.* 2003).

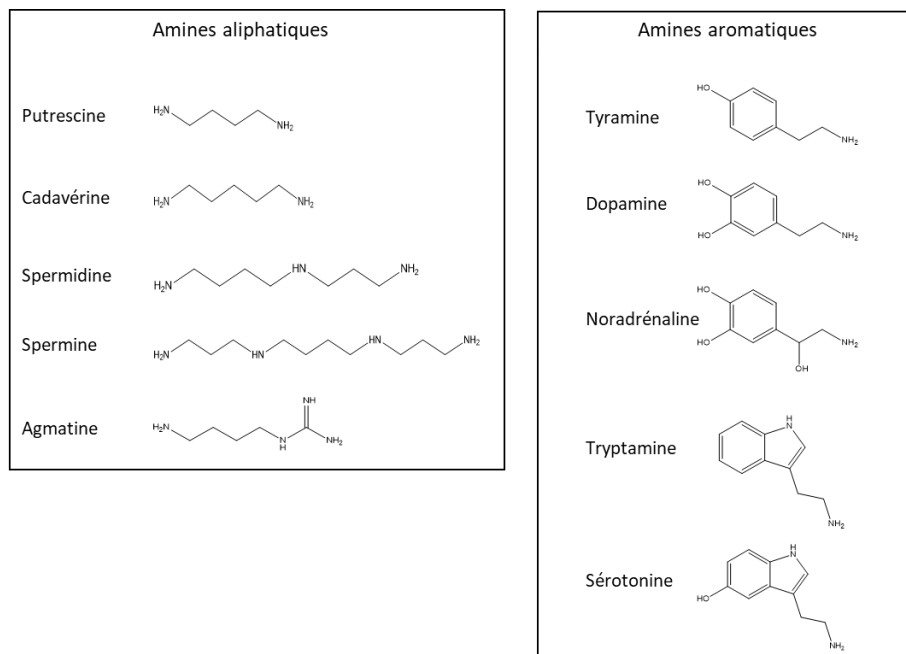


Figure 2 : Exemple de structures chimiques d'amines aliphatiques et aromatiques pouvant entraîner la formation d'amides d'acide hydroxycinnamiques (HCAA)

2. Implication dans les interactions biotiques (Figure 3)

a. *Rôle dans la défense de la plante contre les pathogènes*

Les HCAA peuvent être décrits comme des phytoalexines (Ube *et al.* 2019). Les phytoalexines sont définies comme des molécules végétales de faible poids moléculaire présentant une activité antimicrobienne et permettant de défendre la plante contre des attaques de pathogènes (Shaw *et al.* 2006). Ces phytoalexines peuvent être stockées dans les cellules végétales et relarguées en présence d'un pathogène, ou synthétisées de novo après perception de ce dernier (Shaw *et al.* 2006). L'infection par des pathogènes fongiques ou bactériens entraîne une forte augmentation de la production d'HCAA (Häusler *et al.* 2014). L'infection de la tomate par *Pseudomonas syringae* conduit par exemple à une augmentation de la production de plusieurs dérivés HCAA parmi lesquels la coumaroyl-dopamine et la féruloyl-dopamine (Zacares *et al.* 2007). Une étude protéomique et métabolomique chez le blé a également montré que les HCAA constituaient un facteur de résistance majeur contre *Fusarium graminearum* potentiellement du fait de leur rôle dans l'augmentation de l'épaisseur de la paroi végétale (Gunnaiyah *et al.* 2012, Figure 3). Plus récemment, une étude de Ube *et al.* 2019 a étudié la production des HCAA en réponse à l'infection du blé par *F. graminearum* et *Alternaria brassicicola*. Ils ont mis en évidence l'augmentation de la production de 14 HCAAs en réponse à l'infection par les pathogènes avec une forte concentration des dérivés hydroxycoumaroyl-putrescine, hydroxycoumaroyl-agmatine, hydroxycoumaroyl-dehydroagmatine et coumaroyl-agmatine (Ube *et al.* 2019). Ils ont également pu mettre en évidence deux nouveaux dérivés, la N-cinnamoyl-9-hydroxy-8-oxotryptamine et la N-cinnamoyl-8-oxotryptamine qui présentent une activité inhibitrice sur la germination des spores de *F. graminearum* et *A. brassicicola* (Figure 3). L'augmentation de la production d'HCAA en réponse à l'infection par les pathogènes et leur activité antimicrobienne permet de classer les HCAA comme des phytoalexines majeures chez le blé (Ube *et al.* 2019).

b. *Rôle dans les interactions avec le rhizomicrobiote*

La présence des HCAA au niveau des racines et dans la subérine, associée à leur activité biologique suggèrent un rôle dans les interactions de la plante avec son rhizomicrobiote (Garça

et al. 2015). A notre connaissance, aucune étude n'a encore évalué le rôle des HCAA dans les interactions entre le blé et son rhizomicrobiote. Néanmoins, l'étude de la production d'HCAA dans le contexte des interactions endomycorhizienne entre l'oignon et le champignon *Glomus intraradix* montre par exemple que des HCAA tel que la N-féruoyl-tyramine seraient impliqués dans le contrôle de l'interaction et de l'endophytisme en induisant le branchement des hyphes mais diminuant la croissance totale du champignon (*Grandmaison et al.* 1993, **Figure 3**). Plus récemment, une étude métabolomique réalisée sur le riz a montré une augmentation de la production des HCAA en réponse à l'inoculation de plusieurs bactéries phyto bénéfiques appartenant à des genres différents (*Valette et al.* 2019). De façon intéressante, quatre dérivés HCAA (i.e. la N-p-coumaroyl-putrescine, la N-féruoyl-putrescine, la N-féruoyl-cadaverine et la N-féruoyl-glycine) étaient augmentés en présence de souches phyto bénéfiques du genre *Azospirillum* et *Herbaspirillum* mais diminués en présence du pathogène *Paraburkholderia glumae*. Ces données montrent l'implication, mais aussi la complexité du rôle que peuvent jouer les HCAA dans les interactions rhizosphériques et l'intérêt d'étudier leur activité biologique sur le rhizomicrobiote.

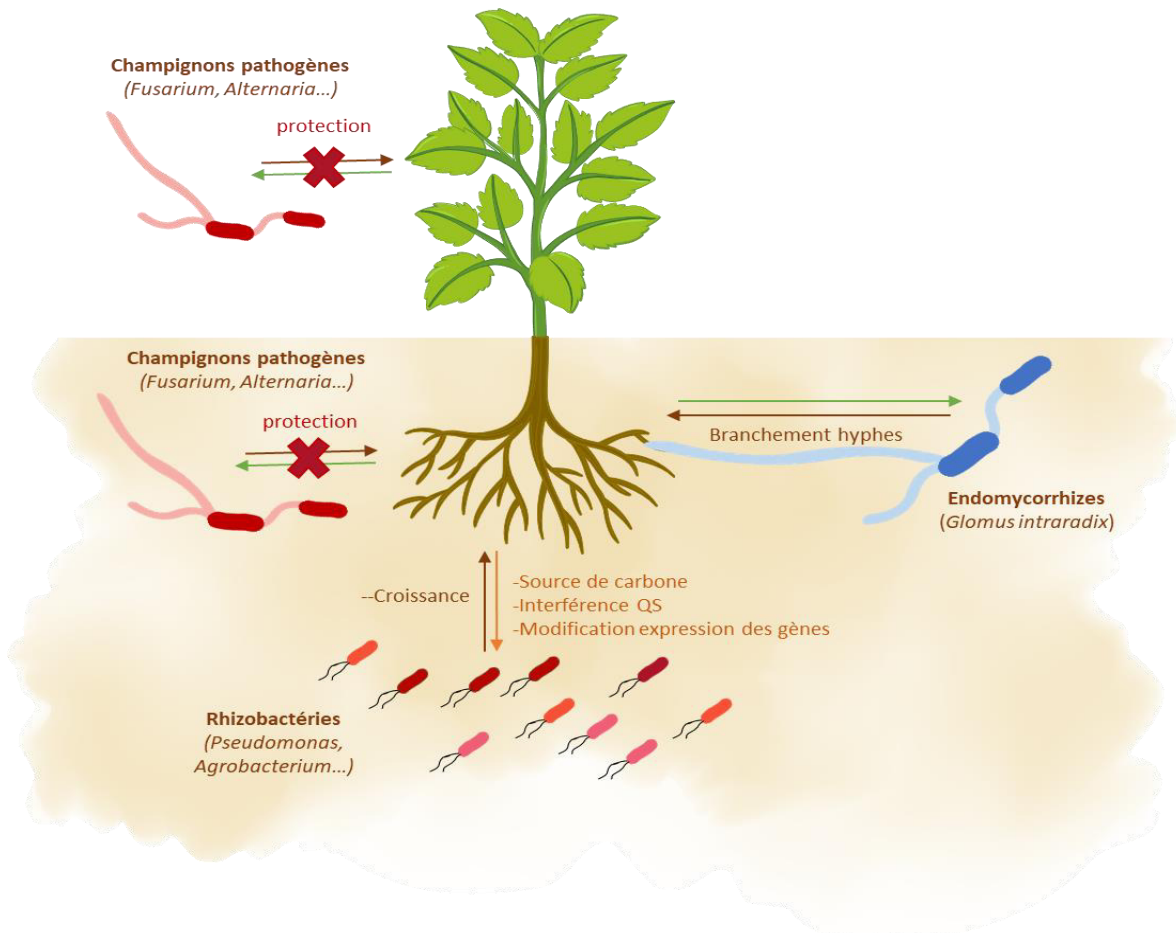


Figure 3 : Schéma récapitulatif de l'implication des acides hydroxycinnamiques (HCA) et des amides d'acides hydroxycinnamiques (HCAA) dans les interactions biotiques végétaux-microorganismes. Les flèches vertes représentent l'activité des HCA sur les micro-organismes. Les flèches oranges représentent l'activité des HCAA sur les micro-organismes. Les flèches marrons représentent la réponse biologique des micro-organismes aux HCA et HCAA. (QS : quorum sensing).

Les flavonoïdes

1. Généralités et biosynthèse

Les flavonoïdes représentent une famille de molécules très diversifiée avec plus de 5000 structures différentes (Wojakowska *et al.* 2012). Ce sont des composés bioactifs de bas poids moléculaire très courants dans le monde végétal (Weston et Mathesius 2013). Ils sont retrouvés à la fois dans les grains, les parties aériennes et les parties racinaires des plantes (Harborne 1993). Plusieurs dérivés de la famille des flavonoïdes ont été détectés dans les graines et les feuilles de blé (Dinelli *et al.* 2011, Wojakowska *et al.* 2012). Ils ont également été retrouvés dans

les racines de plusieurs *Poaceae* telles que le maïs ou le riz (Walker *et al.* 2011, Valette *et al.* 2019). A notre connaissance, aucune étude n'a encore investigué la production de flavonoïdes dans les racines ou les exsudats de blé.

Les flavonoïdes sont des métabolites secondaires issus du métabolisme des phénylpropanoïdes (Falcone *et al.* 2013) (Figure 1). Ils peuvent être sous forme aglycone ou reliés à des sucres. Les formes glycosylées sont souvent moins actives et stockées dans la vacuole des cellules, alors que formes aglycones présentent des activités biologiques importantes (Weston and Mathesius *et al.* 2013). Les flavonoïdes sont impliqués dans plusieurs processus physiologiques tels que la nutrition ou la réponse au stress (Cesco *et al.* 2010, Ma *et al.* 2014). Ils ont une activité antioxydante importante et sont impliqués dans le piégeage des radicaux libres ainsi que dans la réponse à plusieurs stress abiotiques tels que les UV, la sécheresse ou encore la résistance au sel (Brunetti *et al.* 2013, Winkel-Shirley *et al.* 2005, Ma *et al.* 2014, Wahid and Ghazanfar 2005). Le stress hydrique entraîne par exemple une accumulation des flavonoïdes dans les feuilles de plusieurs génotypes de blé dans des proportions différentes en fonction des génotypes (Ma *et al.* 2014). Plusieurs formes aglycones telles que la quercétine, le kaempferol ou l'apigénine sont également capables d'interférer avec le transport de l'auxine et de moduler la croissance racinaire (Peer and Murphy 2007).

Les flavonoïdes peuvent également s'accumuler au niveau des racines, notamment au niveau des cellules de la coiffe et être exsudés dans le sol (Shaw *et al.* 2006). Leur exsudation peut se faire par senescence et dégradation des cellules dans lesquels ils sont stockés ou par le biais de transporteurs (Shaw *et al.* 2006). Des transporteurs ABC sont impliqués dans l'exsudation des flavonoïdes au niveau racinaire mais les mécanismes ne sont pas encore bien connus (Weston and Mathesius 2013). L'exsudation est dépendante de plusieurs facteurs, tels que les UV, le stress hydrique ou encore les attaques de pathogènes (Weston and Mathesius 2013). Une fois exsudés dans la rhizosphère, les flavonoïdes peuvent être impliqués dans des interactions avec le rhizomicrobiote.

2. Implication dans les interactions biotiques (Figure 4)

a. Rôle dans la défense de la plante contre les pathogènes

Comme les HCAA, les flavonoïdes peuvent être décrits comme des phytoalexines (Shaw *et al.* 2006, Hassan and Mathesius 2012). Chez les légumineuses, l'expression de l'isoflavone synthase est par exemple induite par l'acide salicylique (i.e. médiateur de la réponse immunitaire de plante, Lebeis *et al.* 2015) ou par la présence de nématodes pathogènes (Treutter *et al.* 2006, Figure 4). Chez les *Poaceae*, une flavone, la sakuranetine produite par le riz a par exemple sa production augmentée à la suite d'un stress UV ou d'une attaque de pathogène (Ejike *et al.* 2013). De la même façon, des proanthocyanidines et la dihydroquercétine sont impliquées dans la défense de l'orge contre plusieurs espèces de *Fusarium* (Treutter *et al.* 2006).

b. Rôle des flavonoïdes dans les interactions rhizosphériques

Les flavonoïdes sont impliqués dans plusieurs interactions mutualistes (Falcone *et al.* 2013). En effet, ils sont décrits comme les principaux composés médiateurs de la symbiose *Rhizobium*-légumineuses (Broughton *et al.* 2003, Figure 4). Plusieurs dérivés de la famille des flavonoïdes sont capables d'interagir avec la protéine NodD des rhizobiums et d'induire l'expression des gènes (*nod*, *noe*, *nol*) qui codent pour des facteurs Nods qui sont impliqués dans la nodulation (Pérez-Montaño *et al.* 2011). Ces facteurs Nods peuvent entraîner des cascades de signalisation entraînant plusieurs modifications chez la plante allant de la déformation des poils racinaires, à l'augmentation de la division des cellules corticales et à la formation du nodule (Broughton *et al.* 2003, Shaw *et al.* 2006). De leur côté, les *Rhizobium* peuvent ensuite coloniser ce nodule dans lequel ils fixeront l'azote nécessaire au développement de la plante (Broughton *et al.* 2003). Les flavonoïdes interviennent également dans la mise en place de la symbiose actinorhizienne qui associe des actinobactéries du genre *Frankia* à des plantes angiospermes actinorhiziennes (Figure 4). Ils jouent par exemple un rôle important dans l'interaction de la bactérie *Frankia* avec la myrte des marais (*Myrica gale*) (Popovici *et al.* 2010). En effet plusieurs flavonoïdes notamment de la famille des dihydrochalcones produits par *M. gale* peuvent

induire la croissance et la fixation d'azote chez des souches de *Frankia* suggérant un rôle important dans les interactions entre les deux partenaires (Popovici *et al.* 2010).

Les flavonoïdes jouent également un rôle dans les interactions entre les champignons mycorhiziens et leur plantes hôtes dans toutes les étapes de la symbiose. Ils peuvent par exemple intervenir au niveau présymbiotique en favorisant la sporulation et le branchement de hyphes de certains champignons avec une spécificité en fonction des souches et de la structure chimique des flavonoïdes (Scervino *et al.* 2005, **Figure 4**).

Bien que l'activité biologique de flavonoïdes dans les symbioses mutualistes soit bien décrite dans la littérature, leur activité dans les interactions de coopération entre la plante et son rhizomicrobiote sont encore à approfondir (Shaw *et al.* 2006). Plusieurs activités majeures ont néanmoins pu être mises en évidence (**Figure 4**). Une étude de Webster en 1998 a, par exemple, montré que plusieurs dérivés flavonoïdes et plus particulièrement la naringénine favorisait la colonisation des souches phytostimulatrices et fixatrices d'azote *Azorhizobium caulinodans* ORS571 et *Azospirillum brasilense* Sp245 sur les racines de blé (Webster *et al.* 1998). L'utilisation de mutants *nodC* et *nodD* de la souche *A. caulinodans* ORS571 a montré que cette augmentation de la colonisation était *nod*-indépendante, et donc non apparentée aux phénomènes ayant lieu lors de la symbiose *Rhizobium*-légumineuse (Webster *et al.* 1998, Broughton *et al.* 2003). Néanmoins, les auteurs suggèrent que l'augmentation de la croissance et la colonisation racinaire des souches ne soit pas seulement due à un effet trophique via l'utilisation des flavonoïdes comme sources de carbone, mais peut être à la stimulation de gènes bactériens impliqués dans la colonisation des souches (Webster *et al.* 1998).

Les flavonoïdes peuvent également interférer avec la production de métabolites microbiens bioactifs (de Werra *et al.* 2011, Grandclément *et al.* 2016). Une étude *in vitro* a par exemple montré que les catéchines augmentaient de 25% l'expression du gène *pltA* chez *Pseudomonas protegens* CHA0, pouvant aboutir à une augmentation de la production de la pyrrolnitrine, un antimicrobien impliqué dans l'activité phytoprotectrice de CHA0 (de Werra *et al.* 2011, **Figure 4**). Plusieurs flavonoïdes peuvent également interférer avec le QS (**Figure 4**). Certains flavonoïdes peuvent mimer l'activité des médiateurs bactériens et agir comme agonistes des récepteurs du QS (Pérez-Montaño *et al.* 2011). Ils peuvent, par exemple, avoir un effet inducteur sur certaines souches de *Rhizobium* avec des spécificités en fonction des souches et des différents flavonoïdes (Pérez-Montaño *et al.* 2011). L'apigénine est par exemple

capable d'induire l'expression des gènes *rail* et *cinI* impliqués dans la synthèse de médiateurs du QS chez la souche *Rhizobium etli* ISP42 (Pérez-Montaño *et al.* 2011). Inversement, la naringénine présente un effet inhibiteur sur le QS de *Pseudomonas aeruginosa* et limite sa virulence (Vandeputte *et al.* 2011, Grandclément *et al.* 2016). Plusieurs études ont montré que des extraits végétaux étaient capables d'induire ou d'inhiber la production de médiateurs du QS (Teplinski *et al.* 2000). Au vu de l'activité des flavonoïdes sur la production d'AHLs chez *Rhizobium* et *Pseudomonas* et compte tenu du fait que ces molécules soient très courantes dans le monde végétal on peut penser qu'elles peuvent jouer un rôle important dans la régulation des interactions entre bactéries rhizosphériques et entre ces dernières et les plantes.

Enfin, les flavonoïdes peuvent également être dégradés et servir de source de carbone à plusieurs bactéries rhizosphériques (Pillai *et al.* 2002). La souche rhizosphérique *Pseudomonas putida* est, par exemple capable de cataboliser la quercétine aboutissant à la formation de plusieurs produits cataboliques tels que le phloroglucinol (Pillai *et al.* 2002, Figure 4).

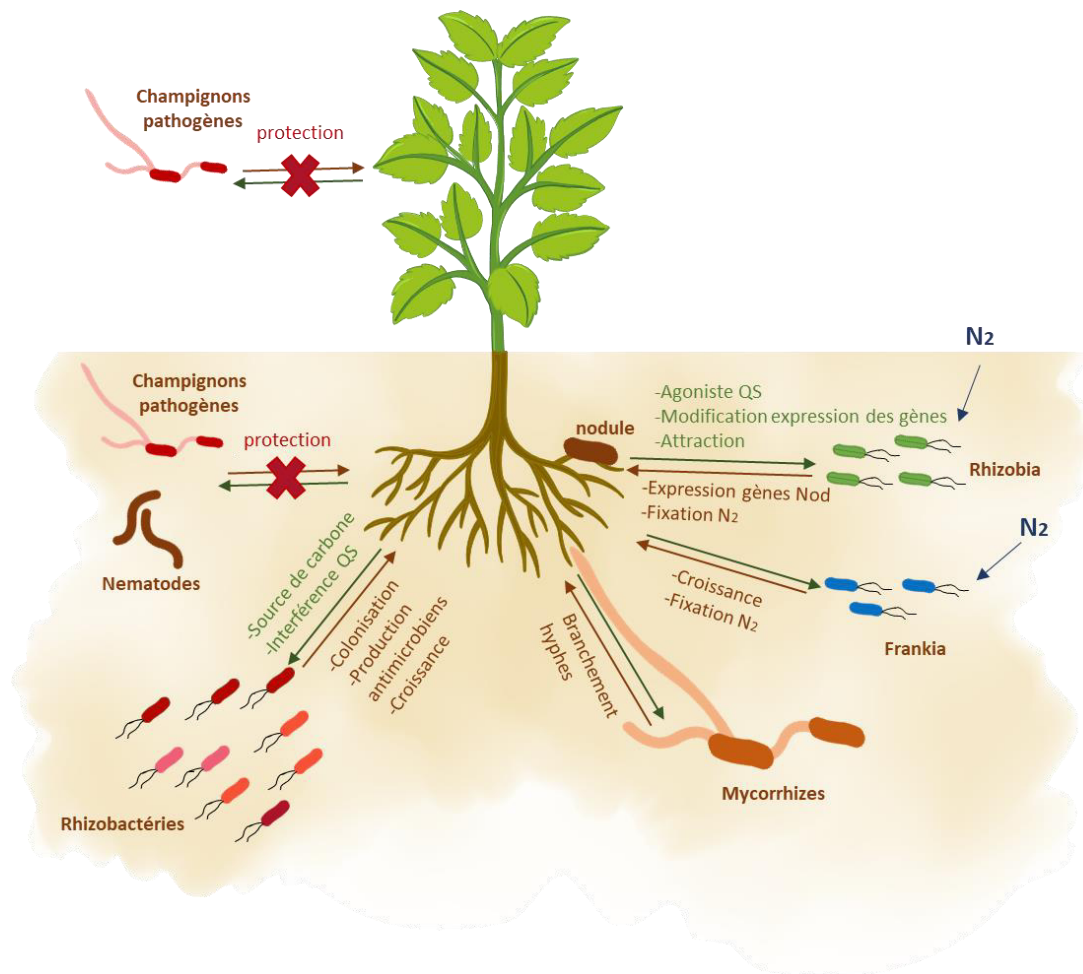


Figure 4 : Schéma récapitulatif de l'implication des flavonoïdes dans les interactions biotiques végétaux-microorganismes. Les flèches vertes représentent l'activité des flavonoïdes sur les micro-organismes. Les flèches marrons représentent la réponse biologique des micro-organismes aux flavonoïdes. (QS : quorum sensing).

Les benzoxazinoïdes

1. Généralités et biosynthèse

Les benzoxazinoïdes constituent un groupe de métabolites secondaires spécialisés très important chez les *Poaceae* et certaines autres familles de plantes (Zhou *et al.* 2018). Ils sont retrouvés dans les feuilles et les racines des jeunes plants de plusieurs espèces telles que le maïs, l'orge ou le blé (Marti *et al.* 2013, Batyshina *et al.* 2020, Soltoft *et al.* 2008). Chez le maïs, les dérivés dominants peuvent par exemple, représenter jusqu'à 0,3% du poids frais de certains tissus (Zhou *et al.* 2018). Les benzoxazinoïdes sont des composés dérivés de l'indole. La

première étape de leur biosynthèse étant décrite comme la production d'indole à partir de l'indole-3-glycérolphosphate par BX1 dans le chloroplaste (Zhou *et al.* 2018, **Figure 5**). La mutation de ce gène BX1 conduit à une forte diminution de la production de benzoxazinoïdes sans forcément altérer la synthèse du tryptophane (Cotton *et al.* 2019, Zhou *et al.* 2018). Plusieurs étapes de biosynthèse aboutissent ensuite à la production des différents dérivés de la famille des benzoxazinoïdes (Walker *et al.* 2011, Schandry and Becker 2020, **Figure 5**).

Les benzoxazinoïdes sont divisés en deux classes, les benzoxazin-3-ones et les benzoxazolinones (**Figure 6**, de Bruijn *et al.* 2016, Soltoft *et al.* 2007). Les benzoxazin-3-ones présents dans les cellules des plantes sont généralement glycosylés et stockés dans la vacuole des cellules végétales pour protéger la plante de leur toxicité (de Bruijn *et al.* 2016, Wouters *et al.* 2016). En cas de dégradation des tissus, ils sont déversés dans le milieu extérieur où ils sont activés par des β -galactosidases ce qui donne lieu aux formes aglycones, plus actives (Wouters *et al.* 2016). Des benzoxazinoïdes glycosylés et non glycosylés peuvent également être exsudés dans la rhizosphère mais par un mécanisme encore inconnu (Zhou *et al.* 2018). Le produit de dégradation des benzoxazin-3-ones est le MBOA qui est décrit dans certaines études comme la forme la plus active (Wouters *et al.* 2016, Hu *et al.* 2018). Ce MBOA peut également être détoxifié par la formation du BOA-6-O-glucoside et du BOA-N-glucoside qui par réarrangement moléculaire aboutit au dérivé carbamate glycosylé (Schulz *et al.* 2017). D'autres systèmes de dégradation, notamment par le biais des micro-organismes peuvent conduire à la formation du 2-aminophénol (2-AP) moins actif. En revanche, ce 2-AP peut, par la suite, se dimériser pour donner un composé actif, le 2-amino-3H-phenoxazin-3-one (APO) plus stable dans le sol (Schandry and Becker 2020).

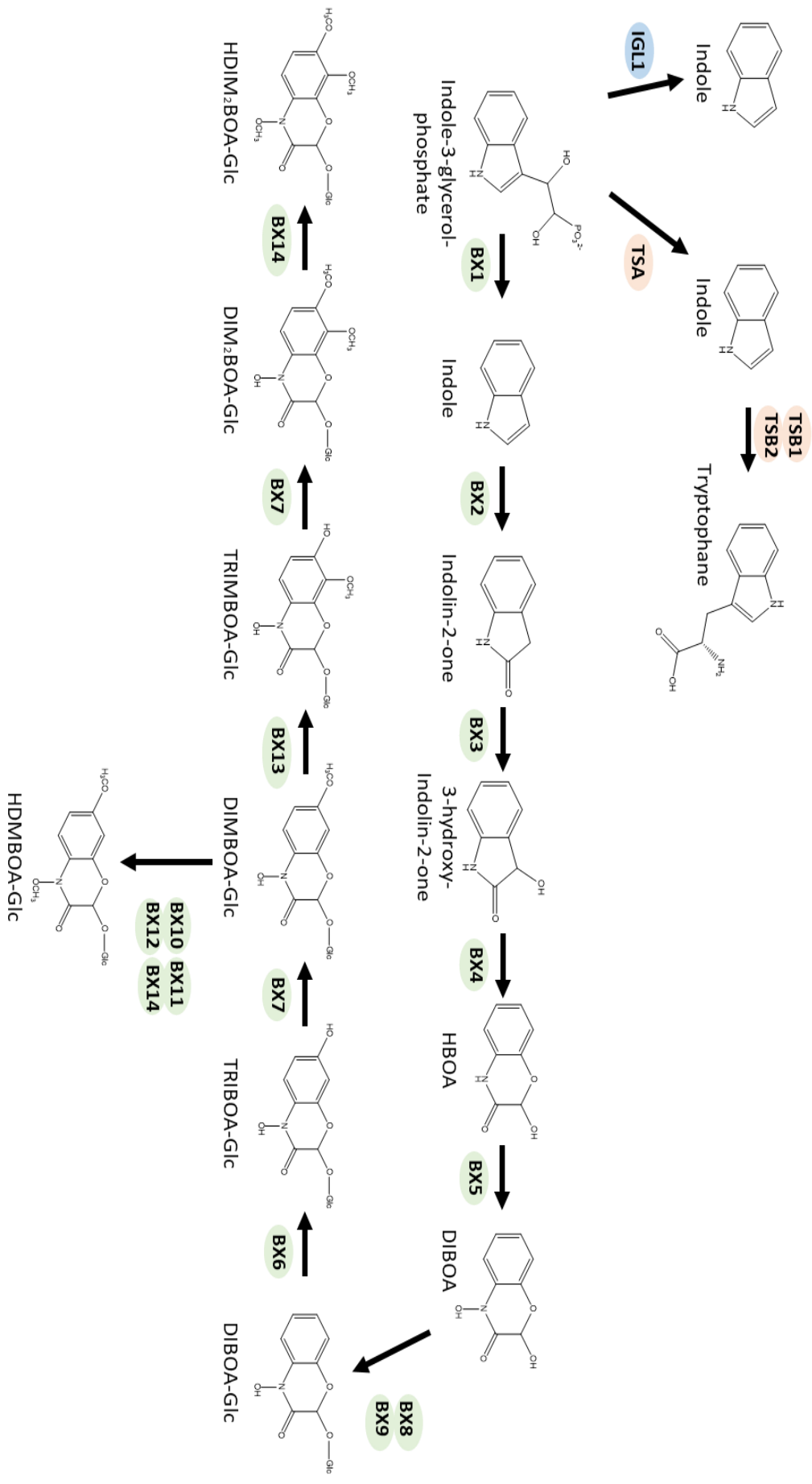


Figure 5 : Voie de biosynthèse des benzoxazinoïdes adaptée de Zhou *et al.* 2018

R1	R2	R3	Nom	Nom systématique
H	H	Glc	DIBOA-Glc	2-O-b-D-Glucopyranosyloxy-4-hydroxy-(2H)-1,4-benzoxazin-3(4H)-one
H	H	H	DIBOA	2,4-Dihydroxy-(2H)-1,4-benzoxazin-3(4H)-one
OCH ₃	H	Glc	DIMBOA-Glc	2-O-b-D-Glucopyranosyloxy-4-hydroxy-7-methoxy-(2H)-1,4-benzoxazin-3(4H)-one
OCH ₃	H	H	DIMBOA	2,4-Dihydroxy-7-methoxy-(2H)-1,4-benzoxazin-3(4H)-one
OCH ₃	OCH ₃	Glc	DIM2BOA-Glc	2-O-b-D-Glucopyranosyloxy-4-dihydroxy-7,8-dimethoxy-(2H)-1,4-benzoxazin-3(4H)-one
OCH ₃	OCH ₃	H	DIM2BOA	2,4-Dihydroxy-7,8-dimethoxy-(2H)-1,4-benzoxazin-3(4H)-one

R1	R2	R3	Nom	Nom systématique
H	H	Glc	HBOA-Glc	2-O-b-D-Glucopyranosyloxy-1,4-benzoxazin-3(4H)-one
H	H	H	HBOA	2-Hydroxy-(2H)-1,4-benzoxazin-3(4H)-one
OCH ₃	H	Glc	HMBOA-Glc	2-O-b-D-Glucopyranosyloxy-7-methoxy-(2H)-1,4-benzoxazin-3(4H)-one
OCH ₃	H	H	HMBOA	2-Hydroxy-7-methoxy-(2H)-1,4-benzoxazin-3(4H)-one
OCH ₃	OCH ₃	Glc	HM ₂ BOA-Glc	2-O-b-D-Glucopyranosyloxy-7,8-dimethoxy-(2H)-1,4-benzoxazin-3(4H)-one
OCH ₃	OCH ₃	H	HM ₂ BOA	2-Hydroxy-7,8-dimethoxy-(2H)-1,4-benzoxazin-3(4H)-one

R1	R2	R3	Nom	Nom systématique
OCH ₃	H	Glc	HDMBOA-Glc	2-O-b-D-Glucopyranosyloxy-4,7-dimethoxy-(2H)-1,4-benzoxazin-3(4H)-one
OCH ₃	H	H	HDMBOA	2-Hydroxy-4,7-dimethoxy-(2H)-1,4-benzoxazin-3(4H) one

R1	R2	Nom	Nom systématique
H	H	BOA	Benzoxazolin-2-one
OCH ₃	H	MBOA	6-Methoxy-benzoxazolin-2-one
OCH ₃	OCH ₃	M2BOA	6,7-Dimethoxy-benzoxazolin-2-one

Figure 6 : Nomenclature des benzoxazinoïdes adaptée de Soltoft *et al.* 2008

2. Implication dans les interactions biotiques

a. *Rôle dans la défense de la plante*

Les benzoxazinoïdes sont considérés comme les principales phytoalexines chez les *Poaceae* (Ube *et al.* 2019). Ils sont particulièrement impliqués dans la défense des plantes contre les pathogènes mais également contre les insectes ravageurs (Marti *et al.* 2013). On les retrouve en plus grosse quantité dans les jeunes plants, mais leur production peut également augmenter chez des plants plus âgés en cas d'attaque de pathogènes ou des ravageurs (Glauser *et al.* 2011). L'infection par les ravageurs *Spodoptera littoralis* et *Spodoptera frugiperda* entraîne, par exemple, une augmentation de la production HMBOA-Glc dans les tissus végétaux (Glauser *et al.* 2011). Si ces tissus sont dégradés par l'insecte herbivore, l'HMBOA-Glc va être au contact de β -galactosidase et être dégradé en HMBOA plus active et toxique pour les insectes (Glauser *et al.* 2011). La production de benzoxazinoïdes est également directement reliée à l'immunité de la plante et peut être sous le contrôle du jasmonate (Maag *et al.* 2016, Macias *et al.* 2006). Chez le maïs, un pic de jasmonate entraîne par exemple une augmentation de la transcription de la DIMBOA-Glc-O-méthyltransférase qui permet la transformation du DIMBOA-Glc en HDMBOA-Glc plus toxique pour les insectes (Maag *et al.* 2016, Glauser *et al.* 2011). De façon intéressante, cette induction est localisée au niveau des tissus endommagés (Maag *et al.* 2016).

Plusieurs études ont également montré l'importance des benzoxazinoïdes dans la résistance des céréales contre les champignons (Niemeyer *et al.* 2009). Néanmoins, l'étude du rôle des benzoxazinoïdes dans la résistance du blé contre la fusariose suggèrent que les benzoxazinoïdes ne soient pas les principales molécules impliquées dans la résistance contre la maladie (Søltoft *et al.* 2008). La relation entre les benzoxazinoïdes et la résistance aux champignons reste encore ambiguë du fait des différents protocoles utilisés dans les études (Niemeyer *et al.* 2009).

b. *Rôle des benzoxazinoïdes dans les interactions rhizosphériques*

Outre leur activité de phytoalexine, les benzoxazinoïdes peuvent avoir un rôle dans la physiologie de la plante. Ils peuvent par exemple interférer avec la production d'auxine et

modifier l'architecture de la plante (Zhou *et al.* 2018). Ils peuvent également être exsudés par les racines et avoir une activité de phytosidérophore (Tipton and Buell 1970). Chez le maïs, les benzoxazinoïdes sont par exemple naturellement exsudés lors de l'émergence de nouvelles racines (Park *et al.* 2004). L'exsudation de ces molécules dans la rhizosphère suggère qu'elles pourraient avoir un rôle dans la protection des jeunes racines contre les pathogènes (Park *et al.* 2004), mais également un impact sur le rhizomicrobiote associé à la plante hôte.

L'impact des benzoxazinoïdes sur le rhizomicrobiote a pu être étudié dans plusieurs travaux. A notre connaissance, toutes ces études ont été réalisées sur le maïs grâce à l'utilisation du mutant *bx1*, produisant de faible quantité de benzoxazinoïdes (Figure 5, Neal *et al.* 2012, Hu *et al.* 2018, Cotton *et al.* 2019). De façon intéressante, les benzoxazinoïdes n'ont pas la même activité sur tous les micro-organismes. Une première étude a par exemple montré que le DIMBOA inhibait la croissance de la souche pathogène *Agrobacterium tumefaciens* mais pas de la souche rhizosphérique *Pseudomonas putida* (Neal *et al.* 2012). En plus de ne pas inhiber sa croissance, le DIMBOA peut avoir un effet attractant sur *P. putida* et favoriser sa colonisation des racines de maïs (Neal *et al.* 2012). Enfin l'utilisation du mutant *bx1* par les mêmes auteurs, a permis de montrer que la souche de *P. putida* pouvait induire l'ISR (résistance systémique induite) et augmenter la résistance de la plante chez le génotype sauvage mais pas chez le mutant *bx1*. Ces études montrent l'implication des benzoxazinoïdes dans l'effet phytoprotecteur d'une bactérie rhizosphérique (Neal *et al.* 2012, Neal and Ton 2013). Plus récemment, une étude a montré que le maïs sauvage était capable de conditionner son rhizomicrobiote et par un effet retour de protéger les prochaines générations de plante contre les attaques de ravageurs (Hu *et al.* 2018, Figure 7). En effet, les plants de la 2^e génération qui poussent dans le sol conditionné par le génotype sauvage ont une meilleure résistance que ceux qui poussent sur le sol conditionné avec le mutant *bx1*. Une expérimentation parallèle avec stérilisation du sol entre la 1^{ère} et la 2^{ème} génération de plantes, a permis de montrer l'implication du microbiote dans ce phénomène (Hu *et al.* 2018). De façon intéressante, la complémentation du sol de *bx1* avec du MBOA permet de retrouver les mêmes effets que ceux obtenus avec le génotype sauvage suggérant que le MBOA seul peut conditionner le rhizomicrobiote du maïs (Hu *et al.* 2018, Figure 7). Ces études montrent l'impact des benzoxazinoïdes dans la sélection d'un rhizomicrobiote capable de favoriser la résistance de la plante (Neal *et al.* 2012, Neal and Ton 2013, Hu *et al.* 2018). Une dernière étude indique que

les métabolites secondaires racinaires pouvaient avoir un effet de régulation sur la plante et réguler la production d'autres métabolites. Ainsi l'effet mis en évidence par Hu *et al.* pourrait ne pas être seulement un effet direct des benzoxazinoïdes sur le rhizomicrobiote mais un résultat de leur effet de régulation sur d'autres métabolites racinaires (Cotton *et al.* 2019). Une analyse métabolomique a permis de mettre en évidence que le métabolome du mutant *bx1* était différent du génotype sauvage avec une modulation importante de la production de flavonoïdes (Cotton *et al.* 2019). Ensuite, une étude parallèle des communautés fongiques et bactériennes a également permis de mettre en évidence des unités taxonomiques opérationnelles (OTUs) enrichies dans le génotype sauvage par rapport au mutant *bx1*. Enfin, une analyse de corrélation entre les métabolites secondaires et les OTUs enrichies dans le génotype sauvage leur a permis de mettre en évidence des métabolites dont la production est corrélée à la présence de certains OTUs et donc potentiellement impliqués dans l'attraction de certain taxa (Cotton *et al.* 2019). Cette dernière étude permet d'aller plus loin dans la compréhension de l'impact des benzoxazinoïdes sur le rhizomicrobiote. Il est néanmoins important de noter que les auteurs attribuent les modifications de métabolome entre le génotype sauvage et le mutant *bx1* à un effet de signalisation des benzoxazinoïdes sur la production d'autres métabolites secondaires racinaires, mais ne discute pas sur l'impact que peut avoir la mutation d'une voie de biosynthèse végétale sur le métabolisme secondaire global de la plante (Cotton *et al.* 2019).

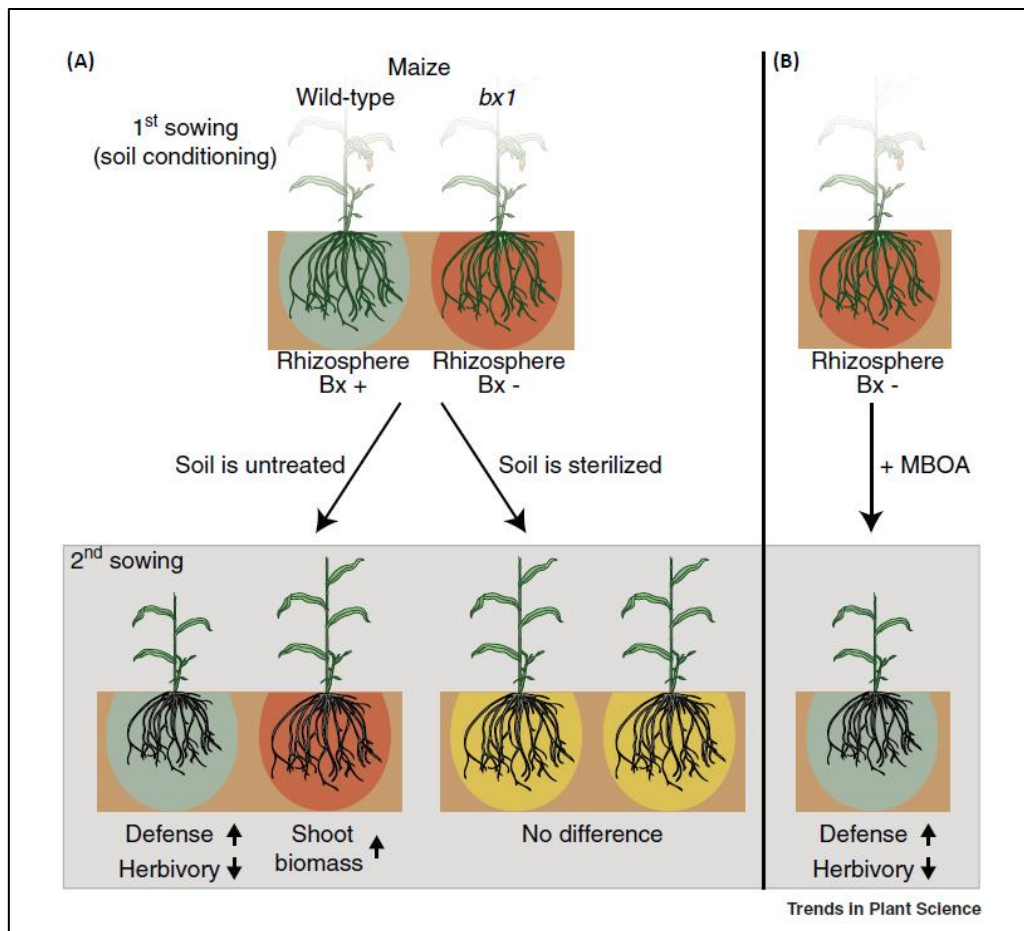


Figure 7 : Influence des benzoxazinoïdes sur le rhizomicrobiote. Au cours de la première génération, le sol est conditionné par du maïs sauvage (sol BX+, vert) ou par un mutant *bx1* (sol BX-, rouge). Lors de la 2^e génération, les plants qui poussent sur le sol BX+ ont une meilleure défense et résistent mieux à l'herbivorie que les plants qui poussent sur le sol BX-. Une stérilisation du sol entre les deux générations de plante supprime les différences montrant l'implication du rhizomicrobiote dans ce phénomène (A). Le sol BX- peut être converti en sol BX+ en ajoutant du MBOA lors de la croissance de la première génération de plante, indiquant l'importance du MBOA dans la mise en place du rhizomicrobiote protecteur (B). Figure issue de Schandry and Becker 2020 et expliquant les résultats obtenus dans l'étude de Hu *et al.* 2018.

References

- Abe, M., Nishikawa, K., Fukuda, H., Nakanishi, K., Tazawa, Y., Taniguchi, T., ... Shindo, M. (2012). Key structural features of cis-cinnamic acid as an allelochemical. *Phytochemistry*, **84**, 56–67.
- Alam, M A, Subhan N, Rahman M M, Uddin S J, Reza H M & Sarker S D. 2014. Effect of Citrus Flavonoids, Naringin and Naringenin, on Metabolic Syndrome and Their Mechanisms of Action. *Advances in Nutrition*, **5**: 404–417.
- Bakker M G, Schlatter D C, Otto-Hanson L & Kinkel L L. 2014. Diffuse symbioses: Roles of plant-plant, plant-microbe and microbe-microbe interactions in structuring the soil microbiome. *Molecular Ecology*, **23**: 1571–1583.
- Bassard J E, Ullmann P, Bernier F & Werck-Reichhart D. 2010. Phenolamides: Bridging polyamines to the phenolic metabolism. *Phytochemistry*, **71**: 1808–1824.
- Batyrshina Z S, Yaakov B, Shavit R, Singh A & Tzin V. 2020. Comparative transcriptomic and metabolic analysis of wild and domesticated wheat genotypes reveals differences in chemical and physical defense responses against aphids. *BMC Plant Biology*, **20**: 1–20.
- Bertrand JC, Caumette P, Lebaron P, Matheron R et Normand P. 2015. Ecologie microbienne : Microbiologie des milieux naturels et anthropisés.
- Bodini S F, Manfredini S, Epp M, Valentini S & Santori F. 2009. Quorum sensing inhibition activity of garlic extract and p-coumaric acid. *Letters in Applied Microbiology*, **49**: 551–555.
- Bollenbach T. 2015. Antimicrobial interactions: Mechanisms and implications for drug discovery and resistance evolution. *Current Opinion in Microbiology*, **27**: 1–9.
- Broughton W J, Zhang F, Perret X & Staehelin C. 2003. Signals exchanged between legumes and Rhizobium: Agricultural uses and perspectives. *Plant and Soil*, **252**: 129–137.
- De Bruijn W J C, Vincken J, Duran K & Gruppen H. 2016. Mass Spectrometric Characterization of Benzoxazinoid Glycosides from *Rhizopus*-Elicited Wheat (*Triticum aestivum*) Seedlings. *J. Agric. Food Chem*, **64**: 6267–6276
- Brunetti C, Di Ferdinando M, Fini A, Pollastri S & Tattini M. 2013. Flavonoids as antioxidants and developmental regulators: Relative significance in plants and humans. *International Journal of Molecular Sciences*, **14**: 3540–3555.
- Cesco S, Neumann G, Tomasi N, Pinton R & Weiskopf L. 2010. Release of plant-borne flavonoids into the rhizosphere and their role in plant nutrition. *Plant and Soil*, **329**: 1–25.
- Corral-Lugo A, Daddaoua A, Ortega A, Espinosa-Urgel M & Krell T. 2016. Rosmarinic acid is a homoserine lactone mimic produced by plants that activates a bacterial quorum-sensing regulator. *Science signaling*, **9**: 409, ra1.
- Cotton T E A, Pétriacq P, Cameron D D, Meselmani M Al, Schwarzenbacher R, Rolfe S A & Ton J. 2019. Metabolic regulation of the maize rhizobiome by benzoxazinoids. *ISME Journal*, **13**: 1647–1658.

- de Werra P, Huser A, Tabacchi R, Keel C & Maurhofer M. 2011. Plant- and microbe-derived compounds affect the expression of genes encoding antifungal compounds in a pseudomonad with biocontrol activity. *Applied and Environmental Microbiology*, **77**: 2807–2812.
- Delude C, Fouillen L, Bhar P, Cardinal M J, Pascal S, Santos, P, ... Domergue F. 2016. Primary fatty alcohols are major components of suberized root tissues of arabidopsis in the form of Alkyl hydroxycinnamates. *Plant Physiology*, **171**: 1934–1950.
- Dinelli G, Segura-Carretero A, Di Silvestro R, Marotti I, Arráez-Román D, Benedettelli S, ... Fernandez-Gutierrez A. 2011. Profiles of phenolic compounds in modern and old common wheat varieties determined by liquid chromatography coupled with time-of-flight mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, **1218**: 7670–7681.
- Ejike C E C C, Gong M & Udenigwe C C. 2013. Phytoalexins from the *Poaceae*: Biosynthesis, function and prospects in food preservation. *Food Research International*, **52**: 167–177.
- El-Seedi H R, El-Said A M A, Khalifa S A M, Göransson U, Bohlin L, Borg-Karlson A K & Verpoorte R. 2012. Biosynthesis, natural sources, dietary intake, pharmacokinetic properties, and biological activities of hydroxycinnamic acids. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **60**: 10877–10895.
- Falcone Ferreyra M L, Rius S P & Casati P. 2012. Flavonoids: Biosynthesis, biological functions, and biotechnological applications. *Frontiers in Plant Science*, **3**: 1–15.
- Fernández M, Corral-Lugo A & Krell T. 2018. The plant compound rosmarinic acid induces a broad quorum sensing response in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. *Environmental Microbiology*, **20**: 4230-4244
- Flemming H C, Wingender J, Szewzyk U, Steinberg P, Rice S A & Kjelleberg S. 2016. Biofilms: an emergent form of bacterial life. *Nature Reviews Microbiology*, **14**: 563–575.
- Glauser G, Marti G, Villard N, Doyen G A, Wolfender J L, Turlings T C J & Erb M. 2011. Induction and detoxification of maize 1,4-benzoxazin-3-ones by insect herbivores. *Plant Journal*, **68**: 901–911.
- Glavina T, Jones C D, Lebeis S L, Paredes S H, Lundberg D S, Breakfield N, ... Dangl J L. 2015. Salicylic acid modulates colonization of the root microbiome by specific bacterial taxa. *Science*, **349**: 860–864.
- Gotti R, Amadesi E, Fiori J, Bosi S, Bregola V, Marotti I & Dinelli G. 2018. Differentiation of modern and ancient varieties of common wheat by quantitative capillary electrophoretic profile of phenolic acids. *Journal of Chromatography A*, **1532**: 208–215
- Graça J. 2015. Suberin: The biopolyester at the frontier of plants. *Frontiers in Chemistry*, **3**: 1–11.
- Grandclément C, Tannières M, Moréra S, Dessaux Y & Faure D. 2015. Quorum quenching: Role in nature and applied developments. *FEMS Microbiology Reviews*, **40**: 86–116.
- Grandmaison J, Olah G M, Van Calsteren M R & Furlan V. 1993. Characterization and localization of plant phenolics likely involved in the pathogen resistance expressed by endomycorrhizal roots. *Mycorrhiza*, **3**: 155–164.
- Gunnaiah R, Kushalappa A C, Duggavathi R, Fox S & Somers D J. 2012. Integrated Metabolo-Proteomic Approach to Decipher the Mechanisms by Which Wheat QTL (Fhb1) Contributes to Resistance against *Fusarium graminearum*. *PlosOne* 7(7)

- Haichar Z, Santaella C & Heulin T. 2014. Root exudates mediated interactions belowground. *Soil Biology and Biochemistry*, **77**: 69–80.
- Hassan S & Mathesius U. 2012. The role of flavonoids in root-rhizosphere signalling: Opportunities and challenges for improving plant-microbe interactions. *Journal of Experimental Botany*, **63**: 3429–3444.
- Harborne, J. B., Introduction to Ecological Bio-chemistry, 4th edn. Academic Press, London, 1993.
- Häusler R E, Ludewig F & Krueger S. 2014. Amino acids - A life between metabolism and signaling. *Plant Science*, **229**: 225–237.
- Hu L, Robert C A M, Cadot S, Zhang X, Ye M, Li B, ... Erb M. 2018. Root exudate metabolites drive plant-soil feedbacks on growth and defense by shaping the rhizosphere microbiota. *Nature Communications*, **9**: 1–13.
- Jin S, Yoshida M, Nakajima T & Murai A. 2003. Accumulation of hydroxycinnamic acid amides in winter wheat under Snow. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, **67**: 1245–1249.
- Maag D, Köhler A, Robert C A M, Frey M, Wolfender J L, Turlings T C J, ... Erb M. 2016. Highly localized and persistent induction of Bx1-dependent herbivore resistance factors in maize. *Plant Journal*, **88**: 976–991.
- Macoy D M, Kim W Y, Lee S Y & Kim M G. 2015. Biosynthesis, physiology, and functions of hydroxycinnamic acid amides in plants. *Plant Biotechnology Reports*, **9**: 269–278.
- Macias FA, Marin D, Oliveros-Bastidas A, Chinchilla D, Simonet A M, Molinillo J M G. 2006. Isolation and synthesis of allelochemicals from *Gramineae*: benzoxazinones and related compounds. *J. Agric. Food Chem.* **54**: 991-1000.
- Marti G, Erb M, Boccard J, Glauser G, Doyen G R, Villard N & Wolfender J L. 2013. Metabolomics reveals herbivore-induced metabolites of resistance and susceptibility in maize leaves and roots. *Plant, Cell and Environment*, **36**: 621–639.
- Martin-Tanguy J. 1985. The occurrence and possible function of hydroxycinnamoyl acid amides in plants. *Plant Growth Regulation*, **3**: 381–399.
- Meyer T, Renoud S, Vigouroux A, Miomandre A, Gaillard V, Kerzaon I, Lavire C. 2018. Regulation of hydroxycinnamic acid degradation drives *agrobacterium fabrum* lifestyles. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, **31**: 814–822.
- Moco S, Vervoort J, Moco S, Bino R J, De Vos R C H & Bino R. 2007. Metabolomics technologies and metabolite identification. *Trends in Analytical Chemistry*, **26**: 855–866.
- Monreal C M & Schnitzer M. 2013. The Chemistry and Biochemistry of Organic Components in the Soil Solutions of Wheat Rhizospheres. *In Advances in Agronomy* 1st ed: Vol. 121
- Nadell C D, Drescher K & Foster K R. 2016. Spatial structure, cooperation and competition in biofilms. *Nature Reviews. Microbiology*, **14**: 589–600.
- Neal A L, Ahmad S, Gordon-Weeks R & Ton J. 2012. Benzoxazinoids in root exudates of maize attract *Pseudomonas putida* to the rhizosphere. *PLoS ONE*, **7**(4).

- Neal A L & Ton J. 2013. Systemic defense priming by *Pseudomonas putida* KT2440 in maize depends on benzoxazinoid exudation from the roots. *Plant Signaling and Behavior*, **8**: 120–124.
- Niemeyer H M. 2009. Hydroxamic acids derived from 2-hydroxy-2h-1,4-benzoxazin-3(4h)-one: Key defense chemicals of cereals. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **57**: 1677–1695.
- Peer W A & Murphy A S. 2007. Flavonoids and auxin transport: modulators or regulators? *Trends in Plant Science*, **12**: 556–563.
- Pérez-Montaña F, Guasch-Vidal B, González-Barroso S, López-Baena F J, Cubo T, Ollero F J, Espuny M R. 2011. Nodulation-gene-inducing flavonoids increase overall production of autoinducers and expression of N-acyl homoserine lactone synthesis genes in rhizobia. *Research in Microbiology*, **162**: 715–723.
- Phelan V V, Liu W-T, Pogliano K & Dorrestein P C. 2011. Microbial metabolic exchange—the chemotype-to-phenotype link. *Nature Chemical Biology*, **8**: 26–35.
- Pillai, B V S & Swarup S. 2002. Elucidation of the Flavonoid Catabolism Pathway. *Microbiology*, **68**: 143–151.
- Plaggenborg R, Overhage J, Steinbüchel A & Priefert H. 2003. Functional analyses of genes involved in the metabolism of ferulic acid in *Pseudomonas putida* KT2440. *Applied Microbiology and Biotechnology*, **61**: 528–535.
- Popovici J, Comte G, Bagnarol É, Alloisio N, Fournier P, Bellvert F, Fernandez M. 2010. Differential Effects of Rare Specific Flavonoids on Compatible and Incompatible Strains in the *Myrica gale*-*Frankia* Actinorhizal Symbiosis. *Applied and Environmental Microbiology*, **76**: 2451–2460.
- Price-Whelan A, Dietrich L E P & Newman D K. 2006. Rethinking “secondary” metabolism: physiological roles for phenazine antibiotics. *Nature Chemical Biology*, **2**: 71–78.
- Raguso R, Agrawal A, Douglas A, Jander G, Kessler A, Poveda K & Thaler J. 2015. The “raison d’être” of chemical ecology. *Ecology*, **96**: 617–630.
- Sachs JL, Mueller UG, Wilcox TP, Bull JJ. 2004. The evolution of cooperation. *Quarterly Review of Biology* **79**: 135–160
- Sanchez S & Demain A L. 2019. Secondary metabolites. *Comprehensive Biotechnology*, 131–143.
- Scervino J M, Ponce M A, Erra-Bassells R, Vierheilig H, Ocampo J A & Godeas A. 2005. Flavonoids exhibit fungal species and genus specific effects on the presymbiotic growth of *Gigaspora* and *Glomus*. *Mycological Research*, **109**: 789–794.
- Schandry N & Becker C. 2020. Allelopathic Plants: Models for Studying Plant–Interkingdom Interactions. *Trends in Plant Science*, **25**: 176–185.
- Schulz M, Sicker D, Schackow O, Hennig L, Yurkov A, Siebers M, Marocco A. 2017. Interspecies-cooperations of *Abutilon theophrasti* with root colonizing microorganisms disarm BOA-OH allelochemicals. *Plant Signaling and Behavior*, **12**: 1–13.
- Shaw L J, Morris P & Hooker J E. 2006. Perception and modification of plant flavonoid signals by rhizosphere microorganisms. *Environmental Microbiology*, **8**: 1867–1880.

- Søltoft M, Jørgensen L N, Svensmark B & Fomsgaard I S. 2008. Benzoxazinoid concentrations show correlation with *Fusarium* Head Blight resistance in Danish wheat varieties. *Biochemical Systematics and Ecology*, **36**: 245–259.
- Starr G, Petersen M A, Jespersen B M & Hansen A S. 2015. Variation of volatile compounds among wheat varieties and landraces. *Food Chemistry*, **174**: 527–537.
- Teplitski M, Robinson J B & Bauer W D. 2000. Plants secrete substances that mimic bacterial N-acyl homoserine lactone signal activities and affect population density-dependent behaviors in associated bacteria. *Molecular Plant-Microbe Interactions*. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, **13**: 637–648.
- Tipton, C.L. and Buell, E.L. .1970. Ferric iron complexes of hydroxamic acids from maize. *Phytochemistry* **9**: 1215–1217.
- Treutter D. 2006. Significance of flavonoids in plant resistance: A review. *Environmental Chemistry Letters*, **4**: 147–157.
- Ube N, Harada D, Katsuyama Y, Osaki-Oka K, Tonooka T, Ueno K, Ishihara A. 2019. Identification of phenylamide phytoalexins and characterization of inducible phenylamide metabolism in wheat. *Phytochemistry*, **167**: 112098.
- Valente J, Gerin F, Le Gouis J, Moënné-Loccoz Y & Prigent-Combaret C. 2020. Ancient wheat varieties have a higher ability to interact with plant growth-promoting rhizobacteria. *Plant Cell and Environment*, **43**: 246–260.
- Valette M, Rey M, Gerin F, Comte G & Wisniewski-Dyé F. 2019. A common metabolomic signature is observed upon inoculation of rice roots with various rhizobacteria. *Journal of Integrative Plant Biology*
- Vandeputte O M, Kiendrebeogo M, Rasamiravaka T, Stévigny C, Duez P, Rajaonson S, el Jaziri M. 2011. The flavanone naringenin reduces the production of quorum sensing-controlled virulence factors in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. *Microbiology*, **157**: 2120–2132.
- Vanholme B, El Houari I & Boerjan W. 2019. Bioactivity: phenylpropanoids' best kept secret. *Current Opinion in Biotechnology*, **56**: 156–162.
- Vanholme R, De Meester B, Ralph J & Boerjan W. 2019. Lignin biosynthesis and its integration into metabolism. *Current Opinion in Biotechnology*, **56**: 230–239.
- Venturi V & Keel C. 2016. Signaling in the Rhizosphere. *Trends in Plant Science*, **21**: 187–198.
- Wahid A & Ghazanfar A. 2006. Possible involvement of some secondary metabolites in salt tolerance of sugarcane. *Journal of Plant Physiology*, **163**: 723–730.
- Walker V, Bertrand C, Bellvert F, Moënné-Loccoz Y, Bally R & Comte G. 2011. Host plant secondary metabolite profiling shows a complex, strain-dependent response of maize to plant growth-promoting rhizobacteria of the genus *Azospirillum*. *New Phytologist*, **189**: 494–506.
- Webster G, Jain V, Davey M R, Gough C, Vasse J, Dénarié J & Cocking E C. 1998. The flavonoid naringenin stimulates the intercellular colonization of wheat roots by *Azorhizobium caulinodans*. *Plant, Cell and Environment*, **21**: 373–383.

- Weston L A & Mathesius U. 2013. Flavonoids: Their Structure, Biosynthesis and Role in the Rhizosphere, Including Allelopathy. *Journal of Chemical Ecology*, **39**: 283–297.
- Winkel-Shirley B. 2002. Biosynthesis of flavonoids and effects of stress. *Current Opinion in Plant Biology*, **5**: 218–223.
- Wojakowska A, Perkowski J, Góral T & Stobiecki M. 2013. Structural characterization of flavonoid glycosides from leaves of wheat (*Triticum aestivum* L.) using LC/MS/MS profiling of the target compounds. *Journal of Mass Spectrometry*, **48**: 329–339.
- Wolfender J, Marti G, Thomas A & Bertrand S. 2015. Current approaches and challenges for the metabolite profiling of complex natural extracts. *Journal of Chromatography A*, **1382**: 136–164.
- Woong J P, Hochholdinger F & Gierl A. 2004. Release of the benzoxazinoids defense molecules during lateral and crown root emergence in *Zea mays*. *Journal of Plant Physiology*, **161**: 981–985.
- Wouters F C, Gershenzon J & Vassão D G. 2016. Benzoxazinoids: Reactivity and modes of action of a versatile class of plant chemical defenses. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, **27**: 1379–1397.
- Wu H, Haig T, Pratley J, Lemerle D & An M. 2001. Allelochemicals in wheat (*Triticum aestivum* L.): Cultivar difference in the exudation of phenolic acids. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **49**: 3742–3745.
- Zacarés L, López-Gresa M P, Fayos J, Primo J, Bellés J M & Conejero V. 2007. Induction of p-coumaroyldopamine and feruloyldopamine, two novel metabolites, in tomato by the bacterial pathogen *Pseudomonas syringae*. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, **20**: 1439–1448.
- Zhou S, Richter A & Jander G. 2018. Beyond defense: Multiple functions of benzoxazinoids in maize metabolism. *Plant and Cell Physiology*, **59**: 1528–1533.

Partie B : Interactions de coopération dans le rhizomicrobiote et intérêt d'exploiter ces interactions dans le cadre d'une agriculture durable

Environmental Science and Pollution Research
<https://doi.org/10.1007/s11356-017-1152-2>

CHEMISTRY, ACTIVITY AND IMPACT OF PLANT BIOCONTROL PRODUCTS



Exploiting rhizosphere microbial cooperation for developing sustainable agriculture strategies

Yoann Besset-Manzoni^{1,2} · Laura Rieusset¹ · Pierre Joly² · Gilles Comte¹ · Claire Prigent-Combaret¹

Received: 1 March 2017 / Accepted: 26 December 2017
© Springer-Verlag GmbH Germany, part of Springer Nature 2018

¹ UMR Ecologie Microbienne, CNRS, INRA, VetAgro Sup, UCBL, Université de Lyon, 43 bd du 11 Novembre 1918, F-69622 Villeurbanne cedex, France

² Biovitis, 15 400 Saint Etienne-de-Chomeil, France

Author contribution Yoann Besset-Manzoni and Laura Rieusset equally contributed to this work as first co-authors. Laura Rieusset designed the figures and tables. All authors participated in writing the manuscript and approved the final version.

Introduction

In the mid-twentieth century, the green revolution ensured food security to face the increasing world population, but it had negative impacts on the environment due to the intensive use of fertilizers and pesticides in ecosystems dedicated to agriculture and livestock. Anthropogenic impacts led to significant changes in communities naturally present in ecosystems, in particular in the soil that contains diverse bacterial, archaeal, fungal, viral, and animal communities (Bardgett and van der Putten 2014). This soil biodiversity contributes to many ecosystem services, such as water storage, carbon sequestration, maintenance of the soil structure, plant productivity, or pest and disease suppression (Barrios 2007). Plant-associated microbial communities play a pivotal role in plant nutrient acquisition, in nitrogen and carbon cycling (Van Der Heijden *et al.* 2008), and also in helping crops tolerate biotic and abiotic stresses (Vacheron *et al.* 2015). Interactions among organisms are important for the good functioning of agrosystems. A second green revolution is currently on its way; it aims to maintain improved crop yields while using reduced levels of chemical inputs and water. In that respect, finding alternatives to the use of chemicals for plant disease control and plant growth stimulation and developing sustainable agriculture strategies are pivotal issues.

Plants are typically associated with a large diversity of microorganisms that can be defined as the plant microbiota. The plant and its leaf, root, and endophyte microbiota make up the plant holobiont (Rosenberg and Zilber-Rosenberg 2016). As for other eukaryote hosts, microbiota are major drivers of host evolution by contributing to their growth, behavior, and adaptation to the environment. Inside the rhizosphere, i.e., the soil zone under the influence of plant roots, some root microbiota microorganisms, called plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR), promote plant growth by improving plant nutrition (via siderophore production, phosphate solubilization, or nitrogen fixation), by modulating plant hormonal pathways (via auxin production, deamination of 1-aminocyclopropane-1- carboxylate), or by protecting plants against pathogens and parasites (Vacheron *et al.* 2013). In the latter case, PGPR are called biocontrol agents and can also protect plant health by eliciting induced systemic resistance (ISR) (Thomashow 2016). In addition, they can also interact with other plant beneficial rhizosphere microorganisms by improving the establishment of symbiosis between *Rhizobium* and Fabaceae and between mycorrhizal fungi and plants. Rhizobia and mycorrhizal

fungi respectively supply nitrogen and phosphate to the host plants. In the latter case, PGPR are defined as mycorrhiza-helper bacteria (MHB) (Deveau and Labbé 2016).

In the rhizosphere, microorganisms benefit from 20% to 50% of photosynthetic carbon (Haichar *et al.* 2014) directly transferred by plant roots or released through mycorrhizal hyphal networks (Kaiser *et al.* 2015). In exchange for C input into the hyphosphere, mycorrhizal fungi retrieve iron, nitrogen, or phosphate resources from the soil surrounding plant roots (Finlay and Clemmensen 2017). If organisms differ in their nutrient needs, they will be unlikely to compete; as a consequence, cooperative interactions may be favored between partners, particularly within multi-species biofilms formed all along the plant root surface (Burdman *et al.* 2000; Couillerot *et al.* 2011).

Microorganisms indeed commonly live in biofilms formed in contact with surfaces or at the level of interfaces. A huge number of articles have demonstrated that cells inside biofilms are in a different physiological state than when they evolve as single planktonic cells (Prigent-Combaret *et al.* 1999; Nakamura *et al.* 2016; Reyes-Pérez *et al.* 2016). Cells are embedded inside an extracellular matrix that they collectively produced (Prigent-Combaret *et al.* 2000; Prigent-Combaret *et al.* 2012; Flemming *et al.* 2016). Sessile cells are usually (a) over-expressing genes involved in sessile biofilm lifestyle, such as exopolysaccharides and fimbriae, and (b) repressing the expression of genes involved in motile lifestyle, such as those encoding flagellae and chemotaxis components (Drogue *et al.* 2014). The close contact of cells inside these heterogeneous three-dimensional structures is conducive to exchanges of (a) nutrients and waste, (b) molecular communication signals (including quorum sensing (QS) molecules, antibiotics, cyclo-lipopeptides, and volatile organic compounds among others), (c) genetic material, and (d) physical signals (Flemming *et al.* 2007, 2016; Prindle *et al.* 2015; Humphries *et al.* 2017). The rapid spread of signaling molecules among cells within biofilms facilitates biotic interactions among the different microbial components (Nadell *et al.* 2016). Gradients of nutrients, dioxygen, or metabolites established within these three-dimensional structures can lead to differential gene expression in the cells of the different biofilm parts. Clusters of cells performing the same function may be formed in biofilms. In this way, the labor achieved by the overall biofilm microbiota is divided between distinct microbial cell clusters (Watnick and Kolter 2000; West and Cooper 2016). Social relationships among cells in a biofilm can be compared to the functioning of social insects living in colonies. Social phenotypes play a major

role in the spatial structuring of microbiota (Nadell *et al.* 2016). Indeed, microbial cells that produce public goods, i.e., compounds that are energetically costly to produce but pivotal for all cells, will typically have the best effects on their closest neighbors (Kreft 2004). From an evolutionary viewpoint, cooperative interactions might be promoted in biofilms and plant microbiota between cells producing public goods (e.g., extracellular enzymes, secondary metabolites like indole or antimicrobial compounds, siderophores, exopolymers, such as cellulose) and cells that do not produce them.

In this review, we address (a) the ecological significance of cooperative interactions between bacterial populations in the rhizosphere, (b) the role of cell–cell chemical and physical communication in root microbiota functioning, and (c) whether better knowledge of these issues can help design new strategies to better stimulate plant growth and protect plants against diseases and to develop novel relevant biocontrol products or biostimulants.

Social behavior in microbial communities

In all ecosystems, species coexist and maintain different interactions with one another. While social behaviors are widely known to play a major role for macro-organism fitness, only in the last decade has growing attention been paid to social behaviors in the microbial world (Crespi 2001). Social behaviors are indeed widespread in microbial life and involved in different types of biotic interactions (Damore and Gore 2012). They contribute to colonization of ecological niches by microorganisms, host infection, and invasion by parasites and pathogens, resistance to invaders, and cooperation.

Ecological significance of microbial cooperation

Cooperation involves at least two partners, i.e., a donor and a recipient that interact with each other, the interaction causing beneficial effects on the recipient, and positive or negative effects on the donor (West *et al.* 2006). Two types of cooperation can be differentiated (Fig. 1): (a) mutual benefits, with positive effects on both the donor and the recipient, and (b) altruistic

relationships, with positive effects on the recipient and negative effects on the donor (West *et al.* 2007a).

From an evolutionary viewpoint, cooperation involving mutual benefits is much more stable because this behavior promotes the fitness of both partners thanks to direct benefits for both the donor and the recipient. The mechanisms allowing for mutual benefits are divided into two groups: non-enforced cooperation (Leimar and Hammerstein 2010) and enforced cooperation (West *et al.* 2007b). As regards enforced cooperation, different mechanisms are involved, like reward, reciprocity, or punishment. These mechanisms are well-described among social insects (Ratnieks and Wenseleers 2008) but less so among microorganisms. Symbiotic interactions between arbuscular mycorrhizal fungi and plants can involve reciprocal rewarding. Plants can detect the best fungal partners and reward them with more carbohydrates that benefit the fungi. In response, mycorrhizal fungi will increase nutrient transfer to plant roots (Kiers *et al.* 2011). Mutual rewarding permits convergence toward an evolutionary stable interaction between the two partners thanks to bidirectional control of the relationships. Mycorrhizal fungi (MF) can also cooperate with bacteria on a reciprocity basis, particularly with bacteria able to solubilize phosphorus. The carbon released by MF can allow phosphate-solubilizing bacteria (PSB) to grow at their close proximity, leading to increased phosphorus availability to MF as a consequence of PSB population increase in the hyphosphere. When MF inaccessible phosphorus is not limiting in the environment, PSB can strongly enhance MF hyphal growth, and thereby allow for beneficial reciprocity between the microbial partners (Zhang *et al.* 2016). Punishment can be involved in plant–microbe interactions. One powerful example is the relationship between non-fixing rhizobia and legumes (Denison 2000). If rhizobia happen to cheat by reducing the level of dinitrogen they fix in nodules, the plant will “punish” them: it will reduce their fitness by reducing the resources available to rhizobia from non-fixing nodules (Kiers *et al.* 2003). In the case of altruism, the donor will ensure a service that is costly to self-produce and will benefit to recipients that do not produce it (Fig. 1). Some altruistic behaviors have been described in multi-cellular bacterial communities, especially in biofilms, like production of exopolysaccharides and cell–cell signaling molecules that can be considered as public goods and are determining factors in biofilm formation (Kreft 2004). How can a behavior that does not lead to direct benefits to the donor be conserved by natural selection? To understand this feature, it is important to remember that microorganisms do not

usually grow independently from one another in most environments: they evolve in biofilms that offer advantages to microbial populations, e.g., increased protection against abiotic stress and improved access to nutrients. Altruistic behaviors will ultimately lead to increased biofilm formation, a positive feature for both the donor and the recipient; that is why altruism might be compatible with natural selection. Programmed cell death is another example of altruistic behavior. Cell death can lead to the release of nutrients to the rest of the bacterial community. Under stressful conditions, bacteria control cell death of part of the population using toxin–antitoxin systems. Under non-stressful conditions, toxins and antitoxins bind to each other and inhibit the activity of toxins on their cellular targets, while under stress conditions, antitoxins are degraded and allow toxins to bind to their cellular targets (Allocati *et al.* 2015).

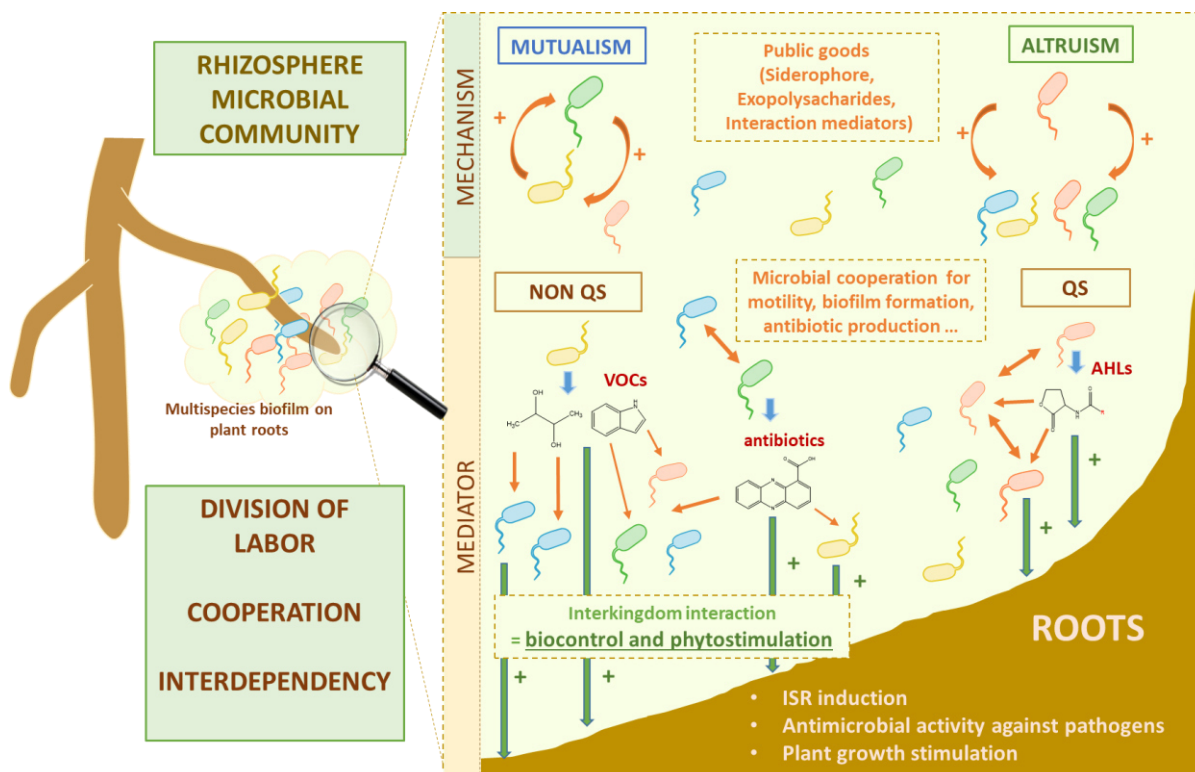


Figure 1: Cooperation in the rhizosphere microbial community and role in host protection against disease and host growth stimulation. It appears that microbial plant protection cannot ensue from one multifunction biocontrol bacterial strain but may result from multi-function microbial consortia. The rhizosphere microbial community is a combination of several interacting bacterial populations (represented in yellow, green, blue, and red). Cooperation implies different mechanisms, such as mutualism (mutual benefits, with positive effects on both the donor and the recipient) and altruism (one donor produces “public goods” for the community that will not necessarily benefit to it). These interactions control microbial behavior and may result in host plant protection and growth stimulation. Cooperation mechanisms involve many microbial compounds that act in bacterium/bacterium and plant/bacterium interactions. They can modulate bacterial behavior inside communities (biofilm formation, antibiotic production, motility ...) and can mediate inter-kingdom effects on host plants (e.g., increase ISR, promote plant growth)

Division of labor in cooperative microbial communities

Division of labor is a common process in cooperative societies, such as those formed by social animals (anthills, beehives, etc.) and humans. It splits complex tasks within a community to make them simpler to perform by individuals or part of the community, and more efficiently at the whole community level (Fig. 1). In these types of organizations, individuals perform functions that are beneficial to the whole community. In microbial populations, division of labor may exist as observed for macro-organisms. Selection and evolution of cooperative relationships might be considered accordingly at the population or community levels, and not at the individual level as proposed by Nowak (2006). Nitrification is one example of division of labor in soils. It occurs in two stages: (a) nitritation corresponds to oxidation of ammonia or ammonium into nitrites and (b) nitratation corresponds to oxidation of nitrites into nitrates. These two essential steps in the nitrogen cycle are carried out by different microorganisms: (a) by ammonia-oxidizing bacteria (AOB) (e.g., nitrosobacteria) and ammonia-oxidizing archaea (AOA) for nitritation and (b) by nitrite-oxidizing bacteria (NOB) (e.g., nitrobacteria) for nitratation (Ward 2013). Splitting the accomplishment of a functional process permits a better process rate, while completing a whole process provides for a better process yield (Costa *et al.* 2006). Nitrification was long thought to be necessarily performed by two types of functional groups, AOB and NOB, with the conclusion that natural selection had favored better nitrification rates than better yield. However, it recently turned out that certain bacterial populations are capable of accomplishing the full nitrification cycle (Santoro 2016). This new discovery raises important evolution and ecological questions. Division of labor in a microbial community seems to be based on functional specialization of populations engaged in cooperative interactions. Vacheron *et al.* (2016) screened a collection of around 700 *Pseudomonas* rhizosphere isolates recruited by maize for the presence/absence of 18 plant-beneficial functions contributing to plant nutrition, hormone, and antimicrobial compound production. Bacteria were shown to belong to seven distinct fluorescent *Pseudomonas* subgroups, *Pseudomonas fluorescens*, *Pseudomonas mandelii*, *Pseudomonas jessenii*, *Pseudomonas koreensis*, *Pseudomonas corrugata*, *Pseudomonas chlororaphis*, and *Pseudomonas protegens*. They harbored a mean of 3.6 plant-beneficial functions, and no more than 9 functions. Therefore, plants seem to favor the recruitment of bacteria with a limited number of functions in their rhizosphere. We can hypothesize that, a bacterium with few functions will be

more productive for these given functions than a bacterium with many functions that would be less efficient in performing each of them. In addition, the distribution of plant-beneficial functions was studied among the seven fluorescent *Pseudomonas* sub-groups. For most of these functions, distribution was heterogeneous among subgroups: for instance, 2,4-diacetylphloroglucinol (DAPG) production was most prevalent in *P. protegens* and 1-aminocyclopropane-1-carboxylate (ACC) deaminase production was most prevalent in *P. corrugata*. This result suggests that *Pseudomonas* subgroups specialized in performing distinct functions. Bacterial specialization may strengthen cooperation between bacterial populations evolving in a same niche. This feature echoes with the Black Queen hypothesis (Morris *et al.* 2012). This theory conceptualizes how selection can lead to dependence in microbial communities (Fig. 1). It started from the observation that, in co-evolutionary biotic interactions, such as mutualistic symbiosis, deletion of redundant functions in genomes is often observed, more particularly in endosymbionts. In bacteria, loss of genomic material is often associated with loss of functions. The theory indeed states that the functions lost by certain microbial populations in the community will be performed by other microbial populations in their vicinity, and these functions will be beneficial to them. Genome reduction is at the basis of this hypothesis: reduced genome size means fewer functions and specialization of tasks achieved by bacterial populations. Coupling metatranscriptomics and metaproteomics to metagenomics may help to better understand how labor is divided between microbial populations in the rhizosphere, how populations cooperate with one another and with plants, and more widely the way microbes function within the niche (Smith 2001; Tanouchi *et al.* 2012; Wang *et al.* 2013).

Chemical and non-chemical signaling involved in the control of microbial cooperation, phytostimulation, and biocontrol

Many cooperative interactions take place in concert in the rhizosphere, i.e., both among microbial populations and between microbial populations and plants, and the sum of all of their impacts determines overall plant growth and health. Microbial interactions are mediated by a great diversity of metabolites. An estimated 17% to 42% of predicted ORFs in microbial genomes could be dedicated to their biosynthesis (Phelan *et al.* 2012). The rhizosphere is a zone with a huge diversity of molecules, such as cyclic lipopeptides, siderophores, quorum

sensing molecules, and antibiotics (Keohane *et al.* 2015). Some of these compounds contribute not only to biocontrol effects but also to plant health protection (Venturi and Keel 2016). Some others are involved in microbial cooperation and contribute to inter-kingdom interactions (for instance between bacteria and plants, fungi, or nematodes) (Fig. 1) (Audrain *et al.* 2015).

The following section focusses on molecules involved in microbial cooperation in the rhizosphere that directly or indirectly influence plant protection against diseases and plant growth stimulation by the root microbiota. Cell communication involves mediators that induce signaling pathways and appropriate responses in the microbial or eukaryotic recipients.

Quorum sensing

Quorum sensing (QS) is the most common communication system in the bacterial world. It prevails in both Gram-negative and Gram-positive bacteria, and even in Archea. QS allows bacteria to monitor their density and to coordinate the expression of genes involved in basic bacterial functions, such as cell division or mobility. It can also regulate functions allowing bacteria to adapt to a given environment, like luminescence, virulence, production of extracellular enzymes and antibiotics, or biofilm formation (Elias and Banin 2012). This process is mediated by different small molecules and autoinducers, such as N-acyl-homoserine lactones (AHLs), small peptides, furan derivatives (auto-inducer system type II, AI-2), quinolones, butyrolactones, or unsaturated fatty acids (Table 1) (LaSarre and Federle, 2013).

One major QS mediator type: AHL

In Gram-negative bacteria like Proteobacteria, QS is commonly mediated by AHLs. QS systems are classically composed of a LuxI-family synthase that synthesizes the AHL signal. Then, AHL interacts at quorum concentrations with a cognate LuxR family transcription factor and affects target gene expression (Venturi and Fuqua 2013). AHLs are small molecules synthesized from S-adenosylmethionine; they differ among species according to the length of their acyl chain, the number of acyl groups, and the number of hydroxyl functions (Pierson 2000). Many soil and rhizosphere bacteria from the species *P. chlororaphis*, *Pseudomonas putida*, *Pseudomonas syringae*, and the genera *Burkholderia*, *Serratia*, *Erwinia*, and *Ralstonia* are known to use QS to

control functions involved in rhizosphere survival and plant health protection or growth stimulation (Venturi and Keel 2016). AHLs are enriched in the rhizosphere, reflecting the high cell density and intensity of communication events occurring among microorganisms (Rosier *et al.* 2016).

AHLs are important for intra- and interspecies communication in the rhizosphere and also play a major role in biocontrol. They have an effect on biocontrol activities through the regulation of antibiotic production in *Pseudomonas* rhizosphere strains. For instance, phenazine antibiotics in *Pseudomonas aureofaciens* 30–84 and in *P. chlororaphis* PCL1391 are synthesized under the positive control of the LuxR-type regulator PhzR, which is activated by Nhexanoyl-homoserine lactone (HHL) (Haas and Keel 2003). AHLs may also have inter-kingdom action. Some are recognized by plant receptors and can modify plant gene expression. *Medicago truncatula* responds to AHL exposure by significantly changing the content of over 150 proteins (Mathesius *et al.* 2003). One third of the proteins differentially regulated in response to AHL treatment depends on AHL structure, especially on the lipid chain length. In addition, AHLs produced by PGPR can induce plant systemic resistance against pathogens, promote plant growth, and stimulate root system development (Venturi and Fuqua 2013; Hartmann and Rothballer 2017). For example, C10-HSL affects primary root growth, lateral root formation, and root hair development (Ortíz-castro *et al.*, 2008). AHLs from the rhizosphere strains *Serratia liquefaciens* and *P. putida* also increase systemic resistance of tomato plants against the pathogen fungus *Alternaria alternata* by inducing salicylic-acid-dependent defense genes (Lareen *et al.* 2016; Schuhegger *et al.* 2006).

Bacterial AHLs also have an impact on certain fungi. For example, *Pseudomonas aeruginosa* 3-oxo-C12 homoserine lactone inhibited *Candida albicans* filamentous growth (Hogan *et al.* 2004). However, up to now, the effect of QS on mycorrhizal fungi has been poorly documented (Frey-Klett *et al.* 2011). Given the importance of QS in the rhizosphere, it would be innovative to better evaluate the role of AHLs on the control of root microbiota population networks and on plant stimulation and biocontrol in agro-systems.

Other QS mediators

Other compounds than AHLs can be involved in QS. For example, recent studies identified aryl-HSLs, α -pyrones, and dialkylresorcinols as chemical messengers from Proteobacteria, with similar mechanisms of action as AHLs. These compounds were evidenced in *Bradyrhizobium*, *Photorhabdus luminescens*, and *Photorhabdus asymbiotica*, respectively (Brameyer *et al.* 2015).

Another class of QS molecules in Gram-negative bacteria are diffusible fatty acids (DSF) produced by rhizosphere species, like *Burkholderia* sp. and *Stenotrophomonas maltophila* (Venturi and Keel 2016). *S. maltophila* can produce antifungal compounds like maltophilin (Jakobi *et al.* 1996). DSF dependent QS in *S. maltophila* regulates properties that can contribute to biocontrol, such as the ability to compete for nutrients and ecological niches (i.e., efficient root colonization, iron chelation). However, the way maltophilin production is regulated in *S. maltophila* is still unknown (Alavi *et al.* 2013). Nevertheless, some bacterial strains belonging to *Burkholderia* sp. and *S. maltophila* are opportunistic pathogens. Therefore, they cannot be used as biocontrol agents until proof is made that the selected strains belong to different clusters of strains from those of human pathogens.

The auto-inducer AI-2 is another mediator that mediates interspecies communication (Waters and Bassler 2005). AI-2 synthase is present in genomes of both Gram-negative and Gram-positive species. Interspecies quorum sensing involving the AI-2 system not only is limited to interactions among bacteria but also occurs between bacteria and fungi (Elias and Banin 2012). Further research will have to be performed to determine whether interactions mediated by AI-2 could impact the biocontrol and phytostimulation properties of rhizobacteria.

Quorum quenching

QS plays key roles in cooperative interactions within the root microbiota and in regulating PGPR effects, especially in biocontrol, but it is also involved in the control of virulence gene expression in many bacterial pathogens. For example, virulence of the economically consequential plant pathogen *Pectobacterium atrosepticum* is modulated by QS AHLs (Faure *et al.* 2009). Inhibiting plant pathogen QS, also named quorum quenching (QQ), is a biocontrol strategy that recently emerged as powerful for sustainable agriculture development (Faure *et al.* 2009).

The QQ strategy involves various compounds with different mechanisms of action (Table 1). Enzymes like lactonases, reductases, oxidases, or amidases degrade or modify AHL chemical functions and thereby prevent QS. QS inhibitors (QSi) are molecules that can interfere with auto-inducer synthesis independently of direct modifications of their structures. They can have an antagonistic effect on auto-inducer receptors or can inhibit the transduction of auto-inducer signals (Hirakawa and Tomita 2013). These molecules may have a low environmental impact on agrosystems as compared to chemical pesticides currently used in crop cultures (Grandclément *et al.* 2016). QSis are produced by bacteria, fungi, or animals, but the main source of natural QSis is higher plants. Their chemical structures are diverse; up to now, no direct correlation has been established between QSi molecular structure and their targets in QS pathways (Grandclément *et al.* 2016).

Numerous bacteria present in the root microbiota can produce QSis or degrade/modify AHLs. For example, genera like *Bacillus*, *Delftia*, *Rhodococcus*, *Pseudomonas*, and *Ochrobactrum* can degrade *Pectobacterium* QS molecules. *Rhodococcus erythropolis* has recently been proposed as a biocontrol agent against *Pectobacterium*. *R. erythropolis* does not inhibit pathogen growth, but it efficiently prevents *Pectobacterium* QS signals from accumulating, thereby limiting its virulence (Barbey *et al.* 2013; Dessaux *et al.* 2016). Moreover, biodegradable products, such as γ -caprolactone and γ -heptanolactone, may be used to increase growth and root colonization of *R. erythropolis* populations in order to protect potato plants against *Pectobacterium* (Cirou *et al.* 2007). Host plants can also produce enzymes like lactonase to degrade QS mediators from pathogenic strains. Studies using transgenic potato and tobacco plants expressing the *Bacillus* lactonase synthase gene (*aiiA*) showed enhanced resistance to *Pectobacterium carotovorum* infection (Dong *et al.* 2001).

The efficiency of a given QSi molecule depends on the pathogen. As a consequence, the efficiency of QSis as biocontrol molecules has to be studied and characterized for each of the targeted pathogens (Grandclément *et al.* 2016). As QS communication is widespread in root microbiota bacteria and regulates directly or indirectly many diverse plant beneficial functions in PGPR, QQ may also have a negative impact on the positive effects of biocontrol driven by the root microbiota. Hence, elicitation of ISR by *Serratia marcescens* decreased in genetically modified plants that expressed the *Bacillus* lactonase gene *aiiA* (Ryu *et al.* 2013). To conclude, QQ can be a powerful biocontrol strategy, but more studies are needed to identify

its impact on the cooperative interactions between microbial populations within the root microbiota and plants in the field.

Signaling compounds that do not belong to the QS system

Antibiotic production in the rhizosphere

Antibiotics can be defined as a chemically heterogeneous group of small organic molecules of microbial origin that have deleterious effects on the growth or on the metabolic activities of other microorganisms (Thomashow *et al.* 1997). However, this definition gradually shifted over time: even if antibiotics may inhibit microbial growth or be implied in competitive interactions or in defense against predators (Jousset and Bonkowski 2010; Keohane *et al.* 2015), they could be involved in intercellular signaling within microbial communities (Combes-Meynet *et al.* 2011). Similarly, to a majority of biological metabolites, their activity is dose-dependent. At high concentrations, they can be a weapon against other bacteria, while at sub-lethal concentrations, they can have diverse other roles (i.e., control of biofilm formation, motility, biosynthetic pathways) in the bacterial world (Raaijmakers and Mazzola, 2012; Combes-Meynet *et al.* 2011; Couillerot *et al.* 2009). They also have inter-kingdom signaling effects on plants or ectomycorrhizal fungi and thereby can play a role in promoting plant growth (Brazelton *et al.* 2008; Jousset and Bonkowski 2010; Riedlinger *et al.* 2006).

Rhizobacterial strains can produce a great diversity of antibiotics (Table 1). This property is fundamental for their biocontrol potential. For example, PGPR belonging to the fluorescent *Pseudomonas* group can produce antimicrobial compounds, such as 2,4-diacetylphloroglucinol, phenazin, pyrrolnitrin, or pyoluteorin (Vacheron *et al.* 2016; Haas and Keel 2003). Other rhizosphere genera like *Streptomyces* or *Bacillus* also produce a wide range of antimicrobial compounds involved in their biocontrol properties (Traxler and Kolter 2015; Solanki *et al.* 2015).

Antibiotic production is influenced by microbial interactions (Rosier *et al.* 2016). Some antibiotics have a broad spectrum and allow bacteria to defend themselves against predators like bacterivorous nematodes and protozoa (Brazelton *et al.* 2008; Jousset and Bonkowski 2010). The presence of bacterivorous eukaryotes may enhance bacterial antibiotic production, which is energy-consuming and has to be adjusted according to the predation risk (Jousset and Bonkowski 2010). For example, the model predator *Acanthamoeba castellanii* induces

antibiotic production by the biocontrol strain *P. fluorescens* Q2–87 (Jousset and Bonkowski 2010). The hypothesis formulated by Jousset *et al.* in 2010 is that bacteria perceive predators by sensing chemical compounds they excrete and respond to them by enhancing their antibiotic production.

2,4-Diacetylphloroglucinol

2,4-Diacetylphloroglucinol (DAPG) is one of the most intriguing compounds synthesized by *Pseudomonas*. At high concentrations, this phenolic compound has a large spectrum of antimicrobial properties against bacteria, fungi, and helminths (Couillerot *et al.* 2009). However, at low concentrations, it also has signaling properties and allows cooperation between PGPR in the rhizosphere, leading to synergetic growth promotion effects on plants. At low concentrations, DAPG acts as a cell–cell communication signal that stimulates auxin production in *Azospirillum* and in turn wheat growth (Combes-Meynet *et al.* 2011). Moreover, it can have interkingdom signaling activity on plants by regulating the auxin biosynthesis pathway and altering root architecture (Brazelton *et al.* 2008). Modulation of auxin production can hence have an impact on symbiosis between plants and ectomycorrhizal fungi (Deveau and Labbé 2016). On the other hand, auxin modulates the gene expression of *phlA* involved in the DAPG biosynthesis pathway and induces DAPG production by *P. protegens* strain CHA0 (deWerra *et al.* 2011). Antibiotic biosynthesis could be regulated by the presence of other antibiotics or rhizosphere mediators. For example, DAPG synthesis in CHA0 is repressed by metabolites, such as salicylate or pyoluterine (Schnider-Keel *et al.* 2000).

Regulation of rhizobacterial antibiotic production by predators like *A. castellanii* could play an important role in biocontrol strategies. DAPG production was indeed strongly induced in the presence of amoeba supernatant, and DAPG appeared as a powerful toxin against amoeba (Jousset *et al.* 2010). However, increased DAPG concentrations may also play a role in biocontrol because they have an antagonistic effect on plant pathogens and can protect plants against them. Therefore, microbial interactions between *A. castellanii* and *P. fluorescens* might increase the biocontrol potential of PGPR. To conclude, the presence of amoeba in the soil can favor *Pseudomonas* biocontrol potential and rhizospheric bacterial cooperation (Jousset *et al.* 2010; Jousset and Bonkowski 2010; Weidner *et al.* 2016).

Phenazines

The phenazine molecular family gathers metabolites sharing a phenazine nucleus. It includes a large diversity of compounds whose activity and specificity differ according to the nature and position of substituents on the heterocyclic ring (Mavrodi *et al.* 2006). They are produced by a wide variety of bacterial genera, especially soil bacteria like *Pseudomonas* or *Streptomyces* (Zhang *et al.* 2015). Phenazines are important biocontrol molecules produced by rhizosphere bacteria, thanks to their antimicrobial activity against a large spectrum of microorganisms (Price-Whelan *et al.* 2006).

Phenazines produced by *Pseudomonas* spp. are much simpler than *Streptomyces* phenazines, with only carboxy- and hydroxy-substituted derivatives. They exhibit strong antifungal activity (Mavrodi *et al.* 2006). For example, phenazine-1- carboxamide (PCA) produced by *P. chlororaphis* PCL1391 controls tomato foot and root rot caused by *Fusarium oxysporum* f. sp. *radices-lycopersici* (Chin-A-Woeng *et al.* 2000). PCA is also active in vitro against *Gaeumannomyces graminis* and several other wheat root pathogens at concentrations as low as 1 µg/ml (Thomashow and Weller 1988). Moreover, phenazines are involved in induction of ISR in tomato and bean against *Botrytis cinerea* (Chin-A-Woeng *et al.* 1998).

Phenazine metabolites are key mediators of biocontrol, by both inhibiting plant pathogens and increasing plant defense against pathogens. However, phenazine compounds are also involved in signaling mechanisms in bacterial communities and can regulate many phenotypes and functions in bacteria, like the size of bacterial colonies, biofilm formation, or iron chelation (Raaijmakers and Mazzola 2012; Keohane *et al.*, 2015). For example, altering the ratio of phenazine derivatives PCA and 2-OH-PCA produced by *P. chlororaphis* affects biofilm formation at different steps: (a) during initial attachment, (b) at the mature biofilm stage, and (c) at the biofilm dispersal stage (Maddula *et al.* 2008).

Lipopeptides

Lipopeptides (LPs) are composed of a lipid tail linked to a short linear or cyclic oligopeptide; in the latter case, compounds are called cyclic LPs (Raaijmakers *et al.* 2010). Their structure confers to them amphipathic and biosurfactant properties (Table 1). They are produced by non-ribosomal peptide synthetases (NRPS) from fungi and bacteria, including rhizosphere

biocontrol strains from the *Bacillus*, *Streptomyces*, and *Pseudomonas* genera. Their large structural diversity is due to differences in the length and composition of their fatty acid tails, as well as in their peptide ring structure (Berry *et al.* 2010; Raaijmakers *et al.* 2006). These compounds share different biological functions, such as (a) motility, (b) attachment to surfaces, (c) antagonism, and (d) parasitism (Raaijmakers *et al.* 2010).

LPs from *Pseudomonas* and *Bacillus* PGPR are the most extensively studied, and a wide diversity of compounds has been reported (Ongena and Jacques 2008). They play a role in motility, biofilm formation, and biocontrol activity (Debois *et al.* 2008; De Bruijn *et al.* 2007, 2008; Kuiper *et al.*, 2004). Root colonization and biofilm formation are indeed the first key steps permitting the efficient expression of biocontrol properties (Burdman *et al.* 2000).

Compounds like massetolide A or amphasin from *Pseudomonas* and surfactin from *Bacillus* are involved in bacterial cell aggregation and cell movement coordination during swarming (Raaijmakers *et al.* 2006; Debois *et al.* 2008). Other *Pseudomonas* LPs like arthofactin and putisolvin are also involved in biofilm formation and maturation (Roongsawang *et al.* 2003; Kuiper *et al.* 2004). The surfactant properties of putisolvin I and II influence the biofilm structure of the producing strains, but also their capacity to break down biofilms formed by other populations (Kuiper *et al.* 2004). LPs also play a direct role in biocontrol owing to their antimicrobial properties. The biocontrol properties of *Bacillus* sp. against *P. syringae* in *Arabidopsis* sp. roots depends on surfactin concentrations (Bais *et al.* 2004). Protection of tomato by *P. fluorescens* against *Phytophthora infestans* is correlated with massetolide A production (Tran *et al.* 2007).

Volatile organic compounds (VOCs)

Volatile organic compounds (VOCs) are mostly small molecules with low molecular mass and high vapor pressure (Table 1). They belong to different chemical families, such as alkenes, alcohols, benzenoids, aldehydes, ketones, or terpenes (Audrain *et al.* 2015). Most microbial VOCs are considered as side products of primary and secondary metabolites and are still poorly studied (Venturi and Keel, 2016; Schmidt *et al.* 2015).

Volatile compounds are known to be involved in interkingdom interactions with plants, animals, or fungi, and they are essential for long-distance interactions in microbial communities

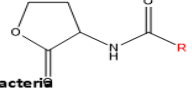
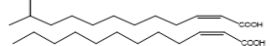
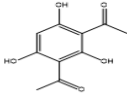
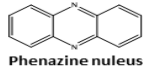
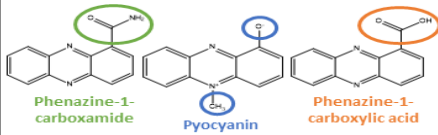
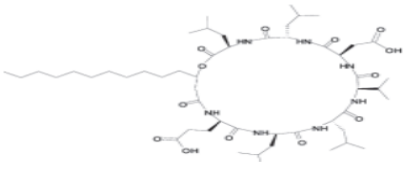

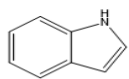
(Audrain *et al.* 2015). Some of these volatile metabolites can act as signals and influence microbial behavior in biofilm formation, virulence, and stress tolerance. For example, nitric oxide (NO) at low concentrations can induce biofilm dispersal in a large number of bacterial species, like *P. aeruginosa*, *S. marcesens*, or *Bacillus licheniformis* (Barraud *et al.* 2009). However, NO also induces biofilm production in a few species, such as in *Azospirillum brasilense* (Di Palma *et al.* 2013). This compound also plays a fundamental role in eukaryotic organisms. Several studies have reported its implication in plant growth (leaf expansion and root growth) and in the activation of plant defense responses (Durner and Klessig 1999).

Certain volatile metabolites belong to the indole family (Blom *et al.* 2011). These compounds are signaling molecules involved in bacterial behavior and physiology, and host/bacterium interactions (Lee and Lee 2010; Lee *et al.* 2015). For example, indole modulates antibiotic resistance in *Escherichia coli*, *P. putida*, or *P. aeruginosa*, promotes biofilm formation in *Agrobacterium tumefaciens* and *Burkholderia unamae* strains, or on the contrary, inhibits biofilm formation in *Acinetobacter baumannii* or *oleivorans* strains (Lee *et al.* 2015). Indole-derived compounds also interfere with QS in a few rhizosphere species like *P. chlororaphis* or *S. marcesens* (Hidalgo-Romano *et al.* 2014). In addition to their role in PGPR biofilm formation, they have an impact on plant growth and plant defense (Lee *et al.* 2015). Indole promotes root development in *Arabidopsis thaliana* by interfering with the auxin signaling machinery (Bailly *et al.* 2014). Moreover, plant auxins are indole derivatives; this reflects the determining role of indole in plant development (Lee and Lee. 2010). Indole and its derivatives have a large array of actions in the plant rhizosphere, so more studies are needed to get a better knowledge of their role in bacterial cooperation, plant protection, and plant growth.

Acetoin and 2,3-butanediol are other important volatile compounds produced by PGPR. For example, their production by *Bacillus subtilis* in the *A. thaliana* rhizosphere promotes ISR and helps protect the host plant against *P. carotovorum* (Ryu 2004). It is also important to note that 2,3-butanediol increases phenazine production in *P. aeruginosa* (Venkataraman *et al.* 2014). In light of this, it would be interesting to determine if this compound can increase phenazine production in PGPR. These two compounds were detected in PGPR strains that triggered plant growth promotion through VOC production, and exogenous application of 2,3-butanediol resulted in a dose-dependent stimulation of plant growth (Ryu *et al.* 2003).

Other VOCs are implied in biocontrol owing to their antimicrobial properties against fungi and bacteria. For example, *P. fluorescens* and *Serratia plymuthica* produce antimicrobial volatile compounds, like dimethyl disulfide, methanediol, and methanethiol acetate, which have a bacteriostatic effect on *A. tumefaciens* and *Agrobacterium vitis*, two broad-spectrum plant pathogens (Schmidt *et al.* 2015). The role and wide diversity of VOCs were recently highlighted in disease suppressive soils (Cordovez *et al.* 2015). Most of them were produced by *Actinobacteria* belonging to the *Streptomyces* genus. They inhibited *Ralstonia solani* growth and promoted plant shoot and root biomass (Cordovez *et al.* 2015). Some VOCs modulate *Brachypodium distachyon* (L.) Beauv biomass production and root system architecture, but their chemical structures have not been identified yet (Delaplace *et al.* 2015).

Table 1: Example of microbial compounds implicated in biocontrol and microbial cooperation

	Compounds	Signalling activity	Biocontrol activity	References
QS MEDIATOR	Acyl homoserine lactone (AHLs)  Producers : Gram negative bacteria	<ul style="list-style-type: none"> - Cellular division - Mobility - Biofilm production - Virulence - Luminescence, - Metabolite production 	Regulation of antibiotic production (e.g. phenazine) Promote ISR	Venturi and Fuqua, 2013
	Diffusible fatty acid (DSF)  Producers : Xanthomonas campestris ; Burkholderia cenocepacia ; Stenotrophomonas maltophilia	<ul style="list-style-type: none"> - Cellular division - Mobility - Biofilm production - Virulence - Luminescence, - Metabolite production 	S. maltophilia biocontrol properties	Venturi and Keel, 2016
QQ MICROBIAL MEDIATOR	Enzyme : <ul style="list-style-type: none"> - Lactonase - Reductase - Amidase - Oxidase QQ enzyme mechanism :	AHLs degradation : modification of bacterial behaviour of both pathogen and PGPR strain. ⇒ Involved in biocontrol and signalisation		Grandclément et al. 2016
ANTIBIOTICS	 DAPG : 2,4-diacetylphloroglucinol Producer : Pseudomonas fluorescents	<ul style="list-style-type: none"> - Modification of metabolite production - Biofilm formation - Plant growth 	Antimicrobial activity against : <ul style="list-style-type: none"> - Bacteria - Fungi - Virus - Helminths Promote ISR	Jousset et al. 2010 Combes-Meynet et al. 2011
	 Phenazine nucleus Example of phenazine compound :  Phenazine-1-carboxamide Pyocyanin Phenazine-1-carboxylic acid	<ul style="list-style-type: none"> - Control bacterial colony size - Biofilm formation - Iron chelation 	Antimicrobial activity against : <ul style="list-style-type: none"> - Bacteria - Fungi Example : <ul style="list-style-type: none"> - <i>Gaeumannomyces graminis</i> - <i>Fusarium oxysporum</i>. Promote ISR	Price-Whelan et al. 2006
	Producer : Pseudomonas sp ; Streptomyces sp			
LIPOPEPTIDES	Cyclolipopeptide  Example of lipopeptides from soil bacteria : <ul style="list-style-type: none"> - <i>Pseudomonas</i> : massetolide A, putisolvin I and II, amphasin, - <i>Bacillus</i> : surfactin 	<ul style="list-style-type: none"> - Mobility, swarming - Biofilm formation and maturation 	Antimicrobial activity against : <ul style="list-style-type: none"> - Bacteria - Fungi - Oomycète - Virus - Protozoa Example : <ul style="list-style-type: none"> - <i>P. syringue</i> - <i>P. infestans</i> 	Raajimiaker et al. 2010 Ongena et al. 2008 Tran et al. 2007 De Bruijn et al. 2008
VOCs	 2,3 butanediol Acetoin	<ul style="list-style-type: none"> - Biofilm production - Motility - Plant growth stimulation 	Promote ISR Example : protect plants against <i>P. carotovorum</i> May increase phenazine production in the rhizosphere <i>Pseudomonas</i> .	Ryu et al. 2004 Audrain et al. 2015
	 Indole and its derivatives	<ul style="list-style-type: none"> - Biofilm production - Quorum quenching - Motility 	Promote ISR Modify metabolite biosynthesis in host plant	Lee et al. 2015
	NO Nitric oxide	<ul style="list-style-type: none"> - Biofilm dispersion - Biofilm formation - Plant growth stimulation 	Antimicrobial property Promote lateral root formation by <i>A. brasilense</i>	Audrain et al. 2015

Non-chemical signaling communication

Besides the involvement of chemical communication in biotic interactions among microbial populations, other forms of microbial communication were recently discovered thanks to advances in nanotechnologies. This was the case for physical communication, which long went unsuspected in the microbial world. Physical communication is less affected by diffusion constraints than chemical communication and thereby may be propagated through a large number of different media, including the rhizosphere. This communication type can afford faster and greater signal transfer in large-scale spaces than chemical communication. In bacteria, three types of physical signals have been described: (a) electrical signals, (b) electromagnetic and acoustic wave signals, and (c) physical contact.

As far as electrical signals are concerned, particular pili synthesized by *Geobacter sulfurreducens*, called nanowires, allow for extracellular electron transfer (Reguera *et al.* 2005). In *B. subtilis*, an electrical signal can be propagated under the form of potassium waves over a long distance through a bacterial community biofilm (Prindle *et al.* 2015). This type of communication system shares some similarity with the nervous system of animals by allowing information to spread to different cells over long distances.

Bacteria can also communicate via acoustic waves (Norris and Hyland 1997). For example, *Bacillus carboniphilus* cells emit acoustic waves between 8 and 43 kHz (Matsushashi *et al.* 1998). These acoustic waves are implied in favoring colony formation under stress conditions (i.e., under non-permissive conditions of KCL concentrations and temperature). Different *E. coli* strains can emit strain-specific acoustic waves (Cox 2014). In an original way, Sarvaiya and Kothari (2015) evaluated the effect of classical Indian music (with frequencies between 38 and 689 Hz) on growth and secondary metabolite and antibiotic production of several bacteria including human pathogens, such as *S. marcescens*, *Staphylococcus aureus*, or *Streptococcus pyogenes*. Positive effects of sound waves were observed on the growth of several strains, and changes in production of pigmented metabolites and greater sensitivity to antibiotics were also recorded. Yet, the precise mechanisms involved in acoustic wave communication are unknown. We can hypothesize that vibrations are sensed by bacterial mechanosensitive ion channels, which in turn trigger adequate responses in the organism exposed to such signals. Thanks to the development of nanotechnologies, new research programs will investigate this

unforeseen kind of communication that could play an unsuspected role in microbial cooperation in the rhizosphere.

Tactile communication is another type of physical communication (Dubey and Ben-Yehuda, 2011). *B. subtilis* synthesizes nanotubes that directly connect two cells to each other. These nanotubes render the direct transfer of cytoplasmic compounds between cells possible, as well as of nonconjugative plasmids. They are involved in both intra- and interspecific communication, and may contribute to cooperative interactions in the rhizosphere, with potential positive impacts on plant health and growth.

Various communication systems have been described as involved in the biotic cooperative interactions between micro- and macro-organisms in the rhizosphere and the hyphosphere. It is obvious that progress should be accelerated to apply existing knowledge about microbial communication under controlled conditions to agro-systems and to the design of new strategies and methods for sustainable cropping.

Toward the commercial use of microbial consortia for biostimulation and biocontrol purposes

A few microbial consortia are tested in the field, and some of them are available on the market. The majority of these consortia are mostly based on the addition of microbial plantbeneficial functions. Cooperation has been empirically exploited in some inoculants, but in most cases, without studying the ways microbial components in a consortium cooperate with one another and with the plant. In addition, it must be taking into account that specific responses to consortia might be observed according to plant genotypes and to soil characteristics as those factors are affecting biostimulation and biocontrol effects of rhizospheric cooperative microorganisms (Vacheron *et al.* 2013). This is probably due to the complexity of these interactions and the difficulty to investigate them in soil agro-systems.

From greenhouse to field applications of microbial consortia

As early as 1995, Belimov and colleagues inoculated barley with several bacteria. They used three different bacterial genera: *Azospirillum*, *Arthrobacter*, and *Agrobacterium*. *Azospirillum*

and *Arthrobacter* strains were used as nitrogen fixers, while the *Agrobacterium* strain was used as a phosphate-solubilizing bacterium (Belimov *et al.* 1995). These three bacteria were inoculated as dual mixed cultures of *Azospirillum-Arthrobacter* or *Azospirillum-Agrobacterium*, or as single cultures, on up to three barley varieties, in greenhouse experiments and in the field. Inoculation with a consortium allowed a better nutrient supply to the plants than single inoculations. In particular, plant mineral nitrogen uptake and phosphate uptake increased. Furthermore, in an acidic soil, the ability of *Azospirillum* to establish in the soil was improved by the presence of *Arthrobacter* and *Agrobacterium* through unknown mechanisms. However, improved viability of *Azospirillum*, a well-known plant growth stimulator, could explain the beneficial effects of the bacterial mixtures on the plants. Similar studies were conducted by Wu and collaborators on maize grown in non-sterile soil in greenhouse (Wu *et al.* 2005). They evaluated the effects of inoculation of mycorrhizal fungi (*Glomus mosseae* or *Glomus intraradices*) in the presence of different bacteria with specific characteristics: an N-fixer (*Azotobacter chroococcum*), a P-solubilizer (*Bacillus megaterium*), or a K-solubilizer (*Bacillus mucilaginosus*). As in Belimov's study, inoculation of the microbial consortium promoted maize growth, both at high and low fertilization levels. It was partly due to greater bioavailability in nitrogen, phosphorus, and potassium for the maize plants as a result of microorganism inoculation. In addition, the consortium improved the soil chemical characteristics (i.e., organic matter and total nitrogen contents). The authors also showed that the mycorrhizal fungi had a higher capacity to infect maize roots in the presence of bacteria. However, high mycorrhizal infection levels of maize negatively impacted phosphate- and potassium-solubilizing bacteria, for reasons unexplained in that study. Singh and Kapoor used a consortium of two phosphate-solubilizing bacteria (*Bacillus circulans* and *Cladosporium herbarum*) and a mycorrhizal fungus (*Glomus* sp.88) to inoculate wheat in a phosphate and nitrogen-poor sandy soil in a greenhouse assay (Singh and Kapoor 1999). They compared the plant-beneficial effects of single microorganisms and mixtures of microorganisms. Inoculation with the three microorganisms together best increased grain and straw yields as compared to non-inoculated wheat or single-inoculated wheat. This increase in growth was correlated with the increase in phosphorus and nitrogen contents in different plant parts (grain, straw, total plant). In addition, the authors studied the culturable bacterial and fungal populations able to solubilize phosphate. While introduction of *B. circulans* positively impacted the phosphate-solubilizing bacterial populations but did not impact fungal populations, inoculation of *C. herbarum* positively

impacted fungal populations. *Glomus* inoculation had a rather low impact on both bacterial and fungal phosphate solubilizing populations. When the three micro-organisms were co-inoculated, both bacterial and fungal populations increased. This correlated to enhanced wheat yields, as well as enhanced phosphorus and nitrogen contents, and established a link between increased nutrient uptake triggered by soil bacterial and fungal plant-beneficial populations on the one hand, and enhanced plant growth on the other hand. Several studies support that bioavailability of essential elements to the plant such as nitrogen, phosphorus, or potassium is improved by crop inoculation with microbial consortia (Zaidi *et al.* 2004; Rudresh *et al.* 2005; Kim *et al.* 2010).

Consortia can also help plants better tolerate abiotic stresses (Nadeem *et al.* 2013). Wang *et al.* (2012) studied the effects of inoculation of a consortium on cucumber plants under drought stress. The *Bacillus–Serratia* consortium made the plants tolerant to drought by protecting cell integrity, maintaining photosynthetic efficiency, and increasing the activity of certain anti-oxidases to prevent reactive oxygen species (ROS) induced by drought stress from accumulating. Other mechanisms have been described as involved in drought resistance; they are reviewed in Vurukonda *et al.* (2016).

Consortia are also involved in plant tolerance to salt stress. The effects of four consortia based on halotolerant bacteria belonging to five genera (*Enterobacter*, *Serratia*, *Microbacterium*, *Pseudomonas*, and *Achromobacter*) were tested on wheat under two different salt concentrations in a climatic growth chamber. Most of the consortia, and especially those containing endophytic bacteria, increased the emergence, growth, and biomass of wheat plants as well as the activity of superoxide dismutase, which is involved in oxidative stress reduction (Barra *et al.* 2016). Several plant hormones are produced by PGPR, or their concentrations inside plants are regulated by PGPR, such as auxin (Lambrecht *et al.* 2000), ethylene (Glick *et al.* 2007), or gibberellins (Bottini *et al.* 2004). These molecules are involved in plant growth stimulation (Dodd *et al.* 2010; Egamberdieva 2013) and tolerance to abiotic stress (Calvo *et al.* 2014). They might also participate to the positive effects of certain microbial consortia on plants, in addition to improving plant nutrition or alleviating the effects of abiotic stress. However, we still need to increase our knowledge of the mechanisms of action triggered by whole consortia on plants, and how these mechanisms are regulated among consortium partners over time.

Two excellent reviews provide an overview of works carried out on consortia used for biocontrol purposes (Pérez-Montaño *et al.* 2014; Sarma *et al.* 2015). Most of the studies evaluated the effectiveness of bacterial consortia in protecting host plants against pathogens by quantifying plant growth (biomass and yield) as well as disease symptoms. Most studies report that consortia performed better than individual strains. Both direct antagonistic effects on pathogens and induction of plant systemic resistance (priming effect) have been described. Using a combination of strains with distinct biocontrol traits can ensure that at least one trait will be efficient in the field (Lucas *et al.* 2009; Sarma *et al.* 2015).

Most of the studies using consortia for biostimulation or biocontrol purposes were carried out under controlled conditions. However, field evaluation was also performed in several cases, and the better performance of consortia versus individuals was confirmed (Srinivasan and Mathivanan 2009; Kumar *et al.* 2011; Sharma *et al.* 2012). Unfortunately, the mechanisms leading to the beneficial effects observed with consortia in the field are mostly unknown. However, it is possible to suggest that the observed effects ensue from the mechanisms highlighted under controlled conditions. Nevertheless, a few studies showed negative interactions between consortium members in the field (Larsen *et al.* 2009), or contrasted results between greenhouse trials and field trials (Smyth *et al.* 2011). Moreover, the impact of consortium introduction into an agro-system has rarely been studied (Sharma *et al.* 2012). Their effects on the microbial community, i.e., on microbial structure, diversity, and activity, as well as on the macro-organisms present in the soil, remain to be investigated. Their introduction can be experienced as a soil disturbance and unbalance the ecosystem that may no longer function optimally (Bardgett and van der Putten 2014). With the advent of - omics methods, means are now available to understand in which directions the plant microbiome that plays a pivotal role in plant growth and health is evolving (Van Der Heijden *et al.* 2008; Berendsen *et al.* 2012; Berg *et al.* 2014). The use of consortia can be an innovative way to explore how the plant microbiome works and decipher how biotic interaction networks in rhizosphere might shift in response to consortium inoculation.

Regulatory viewpoint

From a European regulation viewpoint, the introduction of new products on the market, including microorganisms, thoroughly differs from biostimulation and biocontrol, even more so if applications of microbial consortia are intended. We will not consider the particular case of the USA in the present paper because authorization of new biostimulant products differs among states, as no common law exists at the federal level.

Biostimulation

The biostimulation field currently suffers from non-harmonized regulation in Europe, with different possibilities to access the market depending of the country (i.e., declarative system, authorization with evaluated product, simple notification, and mutual recognition). Biostimulant products are considered as a whole, and their authorization is not always related to their efficiency which is evaluated only in few countries like France or Belgium (Le Mire *et al.* 2016). The global efficiency criterion is preferred, considering the balance between positive and negative effects, and the economical evaluation of the product. Thus, biostimulant products are characterized by “what they do more than by what they are” (du Jardin 2012). A project of European harmonization is currently on its way; it should be implemented in 2018 in order to increase the level of quality of these products and accelerate their commercial development. These products and their components must prove a certain innocuousness and non-toxicity toward animals, plants, and the environment, supported by studies or the existing scientific literature. Authorized products are often isolated from the soil and present profiles with low environmental risks. Considering this, the use of microbial consortia for biostimulation purposes appears to be limitless, and several products using associations of microorganisms are already available for sale on the basis of their independent and/or complementary potential.

Biocontrol

Registration of microorganisms for biocontrol purposes follows exactly the same procedure as other conventional pesticides. Each strain of a consortium must be considered as an independent active substance and be subjected to a strict evaluation by the authorities in order to be included in Annex I of the European Commission Regulation 540/2011. Once approval

has been granted, companies can propose the products to the countries where they want to market them. Each country will then approve or reject the product according to its own criteria. It is now obvious that in the case of consortia, this form of approval does not take into account the possible interactions between the active substances characterized separately. This question has been addressed for decades (Thompson 1996). However, the diversity of new molecules and products that permanently reach the market clearly limits the possibility of an exhaustive viewpoint of this issue. In the case of microorganisms, the only products authorized for plant protection and containing several organisms contain strains characterized for their individual biocontrol activity. To our knowledge, there is presently no biocontrol product sold worldwide containing a microorganism consortium as an active substance. Would-be pioneers in this field will have to deal with the current regulatory constraints and push for the evolution of their restrictive frame in order to defend a unique property only found within a microbial consortium and not expressed by separate microorganisms.

Conclusion

The massive use of pesticides and fertilizers has had adverse ecological impacts on soils and their productivity (Jacobsen and Hjelmsø 2014). Plant and soil microbial communities appear to have been particularly impacted by the use of chemical inputs that was correlated to a loss of biodiversity in agro-systems (Johnsen *et al.* 2001; Singh *et al.* 2015; Nettles *et al.* 2016). In addition, mono-cropping has also considerably reduced field plant genetic diversity, leading to negative effects on the control of pathogen populations (Kennedy *et al.* 2002): once pathogens are established, they can invade fields where low genetic diversity of plant resistance prevails as a result of monoculture. In the Yuanyang region of China, the spread of the rice blast fungus (*Magnaporthe oryzae*) was studied in rice agro-systems. The association of two rice varieties grown at the same time in the field provided better protection of rice against the disease as a whole (Liao *et al.* 2016). *M. oryzae* populations were controlled thanks to the different defense mechanisms from each of the rice varieties, allowing for a better control of fungal virulence and spread. Biodiversity losses can cause loss of organisms ensuring specific roles in agro-systems (Jacobsen and Hjelmsø 2014), leading to their dysfunctioning and de facto reduction of their productivity. In response to the 50% reduction of chemical

pesticide use by 2025 in France (Ecophyto II plan), more research efforts are needed to produce efficient microorganism - or natural substance - based pest control products. In recent years, biostimulants and biocontrol products have been the focus of main research development. However, up to now, these products have often been composed of only one microorganism. However, as emphasized in this review, microorganisms are rarely alone in natural environments, live in communities, and develop many cooperation strategies with other microbial populations. Considering consortia of microorganisms for the development of new plant protection products therefore appears as a relevant issue. Some pharmaceutical or agri-food industries have already taken into account this capacity of micro-organisms to cooperate and to be more efficient when living in concert (Supaphol *et al.* 2006; Brenner *et al.* 2008; Chaucheyras-Durand and Durand 2010; Sabra *et al.* 2010; Smith 2011; Shong *et al.* 2012). These consortia can be used to partly restore the soil biodiversity and therefore potentially lost functions within agro-systems. Such restoration may allow weakened agro-systems to function properly again. Since the discovery of the detrimental effects of intensive agriculture, new, more environment-friendly and ecologically balanced methods of integrated crop production and pest control have been required (Cardinale *et al.* 2003; Bianchi *et al.* 2006; Crowder and Jabbour 2014). Exploiting rhizosphere microbial cooperation can participate in overcoming this challenge.

References

- Alavi P, Müller H, Cardinale M, Zachow C, Sánchez MB, Martínez JL, Berg G (2013) The DSF quorum sensing system controls the positive influence of *Stenotrophomonas maltophilia* on plants. *PLoS One* 8(7): e67103
- Allocati N, Masulli M, Di Ilio C, De Laurenzi V (2015) Die for the community: an overview of programmed cell death in bacteria. *Cell Death Dis* 6:e1609
- Audrain B, Farag MA, Ryu CM, Ghigo JM (2015) Role of bacterial volatile compounds in bacterial biology. *FEMS Microbiol Rev* 39(2):222–233.
- Bailly A, Groenhagen U, Schulz S, Geisler M, Eberl L, Weiskopf L (2014) The inter-kingdom volatile signal indole promotes root development by interfering with auxin signalling. *Plant J* 80(5):758– 771.
- Bais HP, Fall R, Vivanco JM (2004) Biocontrol of *Bacillus subtilis* against infection of *Arabidopsis* roots by *Pseudomonas syringae* is facilitated by biofilm formation and surfactin production. *Plant Physiol* 134(1):307–319.

- Barbey C, Crépin A, Bergeau D, Ouchiha A, Mijouin L, Taupin L, Orange N, Feuilloley M, Dufour A, Burini JF, Latour X (2013) In planta biocontrol of *Pectobacterium atrosepticum* by *Rhodococcus erythropolis* involves silencing of pathogen communication by the rhodococcal gamma-lactone catabolic pathway. *PLoS One* 8(6): e66642.
- Bardgett RD, van der Putten WH (2014) Belowground biodiversity and ecosystem functioning. *Nature* 515(7528):505–511
- Barra PJ, Inostroza NG, Acuña JJ, Mora ML, Crowley DE, Jorquera MA (2016) Formulation of bacterial consortia from avocado (*Persea americana* Mill.) and their effect on growth, biomass and superoxide dismutase activity of wheat seedlings under salt stress. *Appl Soil Ecol* 102:80–91
- Barraud N, Storey MV, Moore ZP, Webb JS, Rice SA, Kjelleberg S (2009) Nitric oxide-mediated dispersal in single- and multi-species biofilms of clinically and industrially relevant microorganisms. *Microb Biotechnol* 2(3):370–378.
- Barrios E (2007) Soil biota, ecosystem services and land productivity. *Ecol Econ* 64(2):269–285.
- Belimov AA, Kojemiakov AP, Chuvarliyeva CV (1995) Interaction between barley and mixed cultures of nitrogen fixing and phosphate solubilizing bacteria. *Plant Soil* 173(1):29–37
- Berendsen RL, Pieterse CMJ, Bakker PAHM (2012) The rhizosphere microbiome and plant health. *Trends Plant Sci* 17(8):478–486.
- Berg G, Grube M, Schloter M, Smalla K (2014) Unraveling the plant microbiome: looking back and future perspectives. *Front Microbiol* 5:148
- Berry C, Fernando WGD, Loewen PC, de Kievit TR (2010) Lipopeptides are essential for *Pseudomonas* sp. DF41 biocontrol of *Sclerotinia sclerotiorum*. *Biol Control* 55(3):211–218.
- Bianchi FJJA, Booij CJH, Tscharntke T (2006) Sustainable pest regulation in agricultural landscapes: a review on landscape composition, biodiversity and natural pest control. *Pro R Soc Lond B Biol Sci* 273(1595):1715–1727.
- Blom D, Fabbri C, Connor EC, Schiestl FP, Klausner DR, Boller T, Weissskopf L (2011) Production of plant growth modulating volatiles is widespread among rhizosphere bacteria and strongly depends on culture conditions. *Environ Microbiol* 13(11):3047–3058
- Bottini R, Cassán F, Piccoli P (2004) Gibberellin production by bacteria and its involvement in plant growth promotion and yield increase. *Appl Microbiol Biotechnol* 65(5):497–503
- Brameyer S, Kresovic D, Bode HB, Heermann R (2015) Dialkylresorcinols as bacterial signaling molecules. *Proc Nat Acad Sci* 112(2):572–577.
- Brazelton JN, Pfeufer EE, Sweat TA, Gardener BBM, Coenen C (2008) 2,4-Diacetylphloroglucinol alters plant root development. *Mol Plant-Microbe Interact* 21(10):1349–1358
- Brenner K, You L, Arnold FH (2008) Engineering microbial consortia: a new frontier in synthetic biology. *Trends Biotechnol* 26(9):483–489
- Burdman S, Okon Y, Jurkevitch E (2000) Surface characteristics of *Azospirillum brasilense* in relation to cell aggregation and attachment to plant roots. *Crit Rev Microbiol* 26(2):91–110.

- Calvo P, Nelson L, Klopper JW (2014) Agricultural uses of plant biostimulants. *Plant Soil* 383(1–2):3–41
- Cardinale BJ, Harvey CT, Gross K, Ives AR (2003) Biodiversity and biocontrol: emergent impacts of a multi-enemy assemblage on pest suppression and crop yield in an agroecosystem. *Ecol Lett* 6(9):857–865
- Chaucheyras-Durand F, Durand H (2010) Probiotics in animal nutrition and health. *Benef Microbes* 1(1):3–9.
- Chin-A-Woeng T, Bloemberg G, van der Bij A, van der Drift K, Schripsema J, Kroon B, Lugtenberg B (1998) Biocontrol by phenazine-1-carboxamide-producing *Pseudomonas chlororaphis* PCL1391 of tomato root rot caused by *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici*. *Mol Plant-Microbe Interact* 11(11):1069–1077.
- Chin-A-Woeng TF, Bloemberg GV, Mulders IH, Dekkers LC, Lugtenberg BJ (2000) Root colonization by phenazine-1-carboxamide-producing bacterium *Pseudomonas chlororaphis* PCL1391 is essential for biocontrol of tomato foot and root rot. *Mol Plant-Microbe Interact* 13(12):1340–1345
- Cirou A, Diallo S, Kurt C, Latour X, Faure D (2007) Growth promotion of quorum-quenching bacteria in the rhizosphere of *Solanum tuberosum*. *Environ Microbiol* 9(6):1511–1522.
- Combes-Meynet E, Pothier JF, Moëgne-Loccoz Y, Prigent-Combaret C (2011) The *Pseudomonas* secondary metabolite 2,4-diacetylphloroglucinol is a signal inducing rhizoplane expression of *Azospirillum* genes involved in plant-growth promotion. *Mol Plant-Microbe Interact* 24(2):271–284.
- Cordovez V, Carrion VJ, Etalo DW, Mumm R, Zhu H, van Wezel GP, Raaijmakers JM (2015) Diversity and functions of volatile organic compounds produced by *Streptomyces* from a disease-suppressive soil. *Front Microbiol* 6:1–13
- Costa E, Pérez J, Kreft J-U (2006) Why is metabolic labour divided in nitrification? *Trends Microbiol* 14(5):213–219.
- Couillerot O, Prigent-Combaret C, Caballero-Mellado J, Moëgne-Loccoz Y (2009) *Pseudomonas fluorescens* and closely-related fluorescent pseudomonads as biocontrol agents of soil-borne phytopathogens. *Lett Appl Microbiol* 48(5):505–512.
- Couillerot O, Combes-Meynet E, Pothier JF, Bellvert F, Challita E, Poirier M-A, Rohr R, Comte G, Moëgne-Loccoz Y, Prigent-Combaret C (2011) Role of the antimicrobial compound 2,4-diacetylphloroglucinol in the impact of biocontrol *Pseudomonas fluorescens* F113 on *Azospirillum brasilense* phytostimulators. *Microbiol* 157(6):1694–1705.
- Cox TJ (2014). The acoustic emissions produced by *Escherichia coli* during the growth cycle. Theses and Dissertations - Animal and Food Sciences. 33. University of Kentucky.
- Crespi BJ (2001) The evolution of social behavior in microorganisms. *Trends Ecol Evol* 16(4):178–183.
- Crowder DW, Jabbour R (2014) Relationships between biodiversity and biological control in agroecosystems: current status and future challenges. *Biol Control* 75:8–17
- Damore JA, Gore J (2012) Understanding microbial cooperation. *J Theor Biol* 299:31–41.

- De Bruijn I, De Kock MJD, Yang M, De Waard P, Van Beek TA, Raaijmakers JM (2007) Genome-based discovery, structure prediction and functional analysis of cyclic lipopeptide antibiotics in *Pseudomonas* species. *Mol Microbiol* 63(2):417–428.
- De Bruijn I, De Kock MJD, De Waard P, Van Beek TA, Raaijmakers JM (2008) Massetolide A biosynthesis in *Pseudomonas fluorescens*. *J Bacteriol* 190(8):2777–2789.
- De Werra P, Huser A, Tabacchi R, Keel C, Maurhofer M (2011) Plant-and microbe-derived compounds affect the expression of genes encoding antifungal compounds in a pseudomonad with biocontrol activity. *Appl Environ Microbiol* 77(8): 2807–2812.
- Debois D, Hamze K, Guérineau V, Le Caër JP, Holland IB, Lopes P, Laprèvote O (2008) In situ localisation and quantification of surfactins in a *Bacillus subtilis* swarming community by imaging mass spectrometry. *Proteomics* 8(18):3682–3691
- Delaplace P, Delory BM, Baudson C, Mendaluk-Saunier de Cazenave M, Spaepen S, Varin S, Brostaux Y, du Jardin P (2015) Influence of rhizobacterial volatiles on the root system architecture and the production and allocation of biomass in the model grass *Brachypodium distachyon* (L.) P. Beauv. *BMC Plant Biol* 15(1):195
- Denison RF (2000) Legume sanctions and the evolution of symbiotic cooperation by *Rhizobia*. *Am Nat* 156(6):567–576.
- Dessaux Y, Grandclément C, Faure D (2016) Engineering the rhizosphere. *Trends Plant Sci* 21(3):266–278
- Deveau A, Labbé J (2016) Mycorrhiza helper bacteria. 437–450.
- Di Palma AA, Pereyra CM, Moreno Ramirez L, Xiqui Vázquez ML, Baca BE, Pereyra MA, Lamattina L, Creus CM (2013) Denitrification derived nitric oxide modulates biofilm formation in *Azospirillum brasilense*. *FEMS Microbiol Lett* 338(1):77–85
- Dodd IC, Zinovkina NY, Safronova VI, Belimov AA (2010) Rhizobacterial mediation of plant hormone status. *Ann Appl Biol* 157(3):361–379
- Dong YH, Wang LH, JL X, Zhang HB, Zhang XF, Zhang LH (2001) Quenching quorum-sensing-dependent bacterial infection by an Nacyl homoserine lactonase. *Nature* 411(6839):813–817.
- Droque B, Sanguin H, Borland S, Prigent-Combaret C, Wisniewski-Dyé F (2014) Genome wide profiling of *Azospirillum lipoferum* 4B gene expression during interaction with rice roots. *FEMS Microbiol Ecol* 87(2):543–555.
- Dubey GP, Ben-Yehuda S (2011) Intercellular nanotubes mediate bacterial communication. *Cell* 144(4):590–600.
- du Jardin P (2012) The science of plant biostimulants - a bibliographic analysis, Ad hoc study report. European Commission, Brussels, p 37
- Durner J, Klessig DF (1999) Nitric oxide as a signal in plants. *Curr Opin Plant Biol* 2(5):369–374
- Egamberdieva D (2013) The role of phytohormone producing bacteria in alleviating salt stress in crop plants. In: Miransari M (ed) *Stress and Plant Biotechnology*. Studium Press LLC, Houston, pp 21–39

- Elias S, Banin E (2012) Multi-species biofilms: living with friendly neighbors. *FEMS Microbiol Rev* 36(5):990–1004.
- Faure D, Vereecke D, Leveau JHJ (2009) Molecular communication in the rhizosphere. *Plant Soil* 321(1–2):279–303
- Finlay RD, Clemmensen KE (2017) Chapter 23—immobilization of carbon in mycorrhizal mycelial biomass and secretions. In: Johnson NC, Gehring C, Jansa J (eds) *Mycorrhizalmediation of soil: fertility, structure, and carbon storage*. Elsevier, Amsterdam, pp 413–440
- Flemming HC, Neu TR, Wozniak DJ (2007) The EPS matrix: the “house of biofilm cells”. *J Bacteriol* 189(22):7945–7947.
- Flemming HC, Wingender J, Szewzyk U, Steinberg P, Rice SA, Kjelleberg S (2016) Biofilms: an emergent form of bacterial life. *Nat Rev Microbiol* 14(9):563–575.
- Frey-Klett P, Burlinson P, Deveau A, Barret M, Tarkka M, Sarniguet A (2011) Bacterial-fungal interactions: hyphens between agricultural, clinical, environmental, and food microbiologists. *Microbiol Mol Biol Rev* 75(4):583–609
- Glick BR, Cheng Z, Czarny J, Duan J (2007) Promotion of plant growth by ACC deaminase-producing soil bacteria. *Eur J Plant Pathol* 119(3):329–339.
- Grandclément C, Tannières M, Moréra S, Dessaux Y, Faure D (2016) Quorum quenching: role in nature and applied developments. *FEMS Microbiol Rev* 40(1):86–116.
- Haas D, Keel C (2003) Regulation of antibiotic production in rootcolonizing *Pseudomonas* spp. and relevance for biological control of plant disease. *Annu Rev Phytopathol* 41:117–153
- Haichar FZ, Santaella C, Heulin T, Achouak W (2014) Root exudates mediated interactions belowground. *Soil Biol Biochem* 77:69–80.
- Hartmann A, Rothballer M (2017) Role of quorum sensing signals of rhizobacteria for plant growth promotion. In: Mehnaz S (ed) *Rhizotrophs: plant growth promotion to bioremediation. Microorganisms for sustainability*, 2nd edn. Springer, Singapore
- Hidalgo-Romano B, Gollihar J, Brown SA, Whiteley M, Valenzuela E, Kaplan HB, McLean RJC (2014) Indole inhibition of N-acylated homoserine lactone-mediated quorum signalling is widespread in Gram-negative bacteria. *Microbiol* 160:2464–2473
- Hirakawa H, Tomita H (2013) Interference of bacterial cell-to-cell communication: a new concept of antimicrobial chemotherapy breaks antibiotic resistance. *Front Microbiol* 4:114
- Hogan DA, Vik Å, Kolter R (2004) A *Pseudomonas aeruginosa* quorum sensing molecule influences *Candida albicans* morphology. *Mol Microbiol* 54(5):1212–1223
- Humphries J, Xiong L, Liu J, Prindle A, Yuan F, Arjes HA, Tsimring L, Süel GM (2017) Species-independent attraction to biofilms through electrical signaling. *Cell* 168(1-2):200–209.
- Jacobsen CS, Hjelmsø MH (2014) Agricultural soils, pesticides and microbial diversity. *Curr Opin Biotechnol* 27:15–20.

- Jakobi M, Winkelmann G, Kaiser D, Kempler C, Jung G, Berg G, Bahl H (1996) Maltophilin: a new antifungal compound produced by *Stenotrophomonas maltophilia* R3089. *J Antibiotics* 49(11):1101–1104
- Johnsen K, Jacobsen CS, Torsvik V, Sørensen J (2001) Pesticide effects on bacterial diversity in agricultural soils—a review. *Biol Fertil Soil* 33(6):443–453.
- Jousset A, Bonkowski M (2010) The model predator *Acanthamoeba castellanii* induces the production of 2,4, DAPG by the biocontrol strain *Pseudomonas fluorescens* Q2-87. *Soil Biol Biochem* 42(9):1647–1649.
- Jousset A, Rochat L, Scheu S, Bonkowski M, Keel C (2010) Predator-prey chemical warfare determines the expression of biocontrol genes by rhizosphere-associated *Pseudomonas fluorescens*. *Appl Environ Microbiol* 76(15):5263–5268
- Kaiser C, Kilburn MR, Clode PL, Fuchslueger L, Koranda M, Cliff JB, Solaiman ZM, Murphy DV (2015) Exploring the transfer of recent plant photosynthates to soil microbes: mycorrhizal pathway vs direct root exudation. *New Phytol* 205(4):1537–1551.
- Kennedy TA, Naeem S, Howe KM, Knops JMH, Tilman D, Reich P (2002) Biodiversity as a barrier to ecological invasion. *Nature* 417(6889):636–638.
- Keohane CE, Steele AD, Wuest WM (2015) The rhizosphere microbiome: a playground for natural product chemists. *Synlett* 26(20):2739–2744
- Kiers ET, Rousseau RA, West SA, Denison RF (2003) Host sanctions and the legume–rhizobium mutualism. *Nature* 425:78–81
- Kiers ET, Duhamel M, Beesetty Y, Mensah JA, Franken O, Verbruggen E, Fellbaum CR, Kowalchuk GA, Hart MM, Bago A, Palmer TM, West SA, Vandenkoornhuyse P, Jansa J, Bucking H (2011) Reciprocal rewards stabilize cooperation in the mycorrhizal symbiosis. *Science* 333(6044):880–882.
- Kim K, Yim W, Trivedi P, Madhaiyan M, Boruah HPD, Islam MR, Lee G, Sa T (2010) Synergistic effects of inoculating arbuscular mycorrhizal fungi and *Methylobacterium oryzae* strains on growth and nutrient uptake of red pepper (*Capsicum annuum* L.). *Plant Soil* 327(1–2):429–440.
- Kreft JU (2004) Biofilms promote altruism. *Microbiology* 150(8):2751–2760.
- Kuiper I, Lagendijk EL, Pickford R, Derrick JP, Lamers GEM, Thomas-Oates JE, Bloemberg GV (2004) Characterization of two *Pseudomonas putida* lipopeptide biosurfactants, putisolvin I and II, which inhibit biofilm formation and break down existing biofilms. *Mol Microbiol* 51(1):97–113
- Kumar H, Dubey RC, Maheshwari DK (2011) Effect of plant growth promoting rhizobia on seed germination, growth promotion and suppression of *Fusarium* wilt of fenugreek (*Trigonella foenumgraecum* L.). *Crop Prot* 30(11):1396–1403
- Lambrecht M, Okon Y, Broek AV, Vanderleyden J (2000) Indole-3-acetic acid: a reciprocal signalling molecule in bacteria–plant interactions. *Trends Microbiol* 8(7):298–300
- Lareen A, Burton F, Schäfer P (2016) Plant root–microbe communication in shaping root microbiomes. *Plant Mol Biol* 90(6):575–587.

- Larsen J, Cornejo P, Barea JM (2009) Interactions between the arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus intraradices* and the plant growth promoting rhizobacteria *Paenibacillus polymyxa* and *P. macerans* in the mycorrhizosphere of *Cucumis sativus*. *Soil Biol Biochem* 41(2): 286–292.
- LaSarre B, Federle MJ (2013) Exploiting Quorum Sensing to confuse bacterial pathogens. *Microbiol Mol Biol Rev* 77(1):73–111
- Le Mire G, Luan Nguyen M, Fassotte B, du Jardin P, Verheggen F, Delaplace P, Haissam Jijakli M (2016) Implementing plant biostimulants and biocontrol strategies in the agroecological management of cultivated ecosystems. A review. *Biotechnol Agron Soc Environ* 20(S1):299–313
- Lee JH, Lee J (2010) Indole as an intercellular signal in microbial communities. *FEMS Microbiol Rev* 34(4):426–444.
- Lee JH, Wood TK, Lee J (2015) Roles of indole as an interspecies and interkingdom signaling molecule. *Trends Microbiol* 23(11):707–718
- Leimar O, Hammerstein P (2010) Cooperation for direct fitness benefits. *Philos Trans R Soc B Biol Sci* 365(1553):2619–2626
- Liao J, Huang H, Meusnier I, Adreit H, Ducasse A, Bonnot F, Pan L, He X, Kroj T, Fournier E, Tharreau D, Gladioux P, Morel J-B (2016) Pathogen effectors and plant immunity determine specialization of the blast fungus to rice subspecies. *elife* 5:e19377
- Lucas JA, Ramos Solano B, Montes F, Ojeda J, Megias M, Gutierrez Mañero FJ (2009) Use of two PGPR strains in the integrated management of blast disease in rice (*Oryza sativa*) in Southern Spain. *Field Crops Res* 114(3):404–410
- Maddula VSRK, Pierson EA, Pierson LS (2008) Altering the ratio of phenazines in *Pseudomonas chlororaphis (aureofaciens)* strain 30- 84: effects on biofilm formation and pathogen inhibition. *J Bacteriol* 190(8):2759–2766
- Mathesius U, Mulders S, Gao M, Teplitski M, Caetano-Anolles G, Rolfe BG, Bauer WD (2003) Extensive and specific responses of a eukaryote to bacterial quorum-sensing signals. *Proc Nat Acad Sci USA* 100(3):1444–1449.
- Matsushashi M, Pankrushina AN, Takeuchi S, Ohshima H, Miyoi H, Endoh K, Murayama K, Watanabe H, Endo S, Tobi M, Mano Y, Hyodo M, Kobayashi T, Kaneko T, Otani S, Yoshimura S, Harata A, Sawada T (1998) Production of sound waves by bacterial cells and the response of bacterial cells to sound. *J Gen Appl Microbiol* 44(1): 49–55.
- Mavrodi DV, Blankenfeldt W, Thomashow LS (2006) Phenazine compounds in fluorescent *Pseudomonas* spp. biosynthesis and regulation. *Annu Rev Phytopathol* 44:417–445
- Morris JJ, Lenski RE, Zinser ER (2012) The black queen hypothesis: evolution of dependencies through adaptive gene loss. *MBio* 3(2): e00036–e00012
- Nadeem SM, Naveed M, Zahir ZA, Asghar HN (2013) Plant–microbe interactions for sustainable agriculture: fundamentals and recent advances. *Plant microbe symbiosis: fundamentals and advances*. 51–103.

- Nadell CD, Drescher K, Foster KR (2016) Spatial structure, cooperation and competition in biofilms. *Nat Rev Microbiol* 14(9):589–600
- Nakamura Y, Yamamoto N, Kino Y, Yamamoto N, Kamei S, Mori H, Kurokawa K, Nakashima N (2016) Establishment of a multi-species biofilm model and metatranscriptomic analysis of biofilm and planktonic cell communities. *Appl Microbiol Biotechnol* 100(16): 7263–7279.
- Nettles R, Watkins J, Ricks K, Boyer M, Licht M, Atwood LW, Peoples M, Smith RG, Mortensen DA, Koide RT (2016) Influence of pesticide seed treatments on rhizosphere fungal and bacterial communities and leaf fungal endophyte communities in maize and soybean. *Appl Soil Ecol* 102:61–69.
- Norris V, Hyland GJ (1997) Do bacteria sing? Sonic intercellular communication between bacteria may reflect electromagnetic intracellular communication involving coherent collective vibrational modes that could integrate enzyme activities and gene expression. *Mol Microbiol* 24(4):879–880.
- Nowak MA (2006) Five rules for the evolution of cooperation. *Science* 314(5805):1560–1563
- Ongena M, Jacques P (2008) Bacillus lipopeptides: versatile weapons for plant disease biocontrol. *Trends Microbiol* 16(3):115–125.
- Ortíz-castro R, Martínez-trujillo M, López-bucio J (2008) N-acyl-L-homoserine lactones: a class of bacterial quorum-sensing signals alter post-embryonic root development in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Environ* 31(10):1497–1509.
- Pérez-Montaño F, Alías-Villegas C, Bellogín RA, del Cerro P, Espuny MR, Jiménez-Guerrero I, López-Baena FJ, Ollero FJ, Cubo T (2014) Plant growth promotion in cereal and leguminous agricultural important plants: from microorganism capacities to crop production. *Microbiol Res* 169(5–6):325–336
- Phelan VV, Liu W-T, Pogliano K, Dorrestein PC (2012) Microbial metabolic exchange—the chemotype-to-phenotype link. *Nature Chem Biol* 8(1):26–35.
- Pierson LS (2000) Expanding the club: engineering plants to talk to bacteria. *Trends Plant Sci* 5(3):89–91
- Price-Whelan A, Dietrich LEP, Newman DK (2006) Rethinking “secondary metabolism:” physiological roles for phenazine antibiotics. *Nature Chem Biol* 2(2):71–78
- Prigent-Combaret C, Vidal O, Dorel C, Lejeune P (1999) Abiotic surface sensing and biofilm-dependent regulation of gene expression in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 181(19):5993–6002
- Prigent-Combaret C, Prensier G, Le Thi TT, Vidal O, Lejeune P, Dorel C (2000) Developmental pathway for biofilm formation in curliproducing *Escherichia coli* strains: role of flagella, curli and colonic acid. *Environ Microbiol* 2(4):450–464.
- Prigent-Combaret C, Zghidi-Abouzid O, Effantin G, Lejeune P, Reverchon S, Nasser W (2012) The nucleoid-associated protein Fis directly modulates the synthesis of cellulose, an essential component of pellicle-biofilms in the phytopathogenic bacterium *Dickeya dadantii*. *Mol Microbiol* 86(1):172–186.
- Prindle A, Liu J, Asally M, Ly S, Garcia-Ojalvo J, Süel GM (2015) Ion channels enable electrical communication in bacterial communities. *Nature* 527(7576):59–63.

- Raaijmakers JM, Mazzola M (2012) Diversity and natural functions of antibiotics produced by beneficial and plant pathogenic bacteria. *Annu Rev Phytopathol* 50:403–424
- Raaijmakers JM, de Bruijn I, de Kock MJD (2006) Cyclic lipopeptide production by plant-associated *Pseudomonas* spp.: diversity, activity, biosynthesis, and regulation. *Mol Plant-Microbe Interact* 19(7): 699–710.
- Raaijmakers JM, de Bruijn I, Nybroe O, Ongena M (2010) Natural functions of lipopeptides from *Bacillus* and *Pseudomonas*: more than surfactants and antibiotics. *FEMS Microbiol Rev* 34(6):1037– 1062.
- Ratnieks F, Wenseleers T (2008) Altruism in insect societies and beyond: voluntary or enforced? *Trends Ecol Evol* 23(1):45–52.
- Reguera G, McCarthy KD, Mehta T, Nicoll JS, Tuominen MT, Lovely DR (2005) Extracellular electron transfer via microbial nanowires. *Nature* 435(7045):1098–1101
- Reyes-Pérez A, María del Carmen Vargas M, Hernández M, Aguirre-von-Wobeser E, Pérez-Rueda E, Encarnación S (2016) Transcriptomic analysis of the process of biofilm formation in *Rhizobium etli* CFN42. *Arch Microbiol* 198(9):847–860.
- Riedlinger J, Schrey SD, Tarkka MT, Hampp R, Kapur M, Fiedler HP (2006) Auxofuran, a novel metabolite that stimulates the growth of fly agaric, is produced by the mycorrhiza helper bacterium *Streptomyces* strain Ach 505. *Appl Environ Microbiol* 72(5): 3550–3557.
- Roongsawang N, Hase Ki, Haruki M, Imanaka T, Morikawa M, Kanaya S (2003) Cloning and characterization of the gene cluster encoding arthrofactin synthetase from *Pseudomonas* sp. MIS38. *Chem Biol* 10(9):869–880
- Rosenberg E, Zilber-Rosenberg I (2016) Microbes drive evolution of animals and plants: the hologenome concept. *MBio* 7(2):e01395
- Rosier A, Bishnoi U, Lakshmanan V, Sherrier DJ, Bais HP (2016) A perspective on inter-kingdom signaling in plant-beneficial microbe interactions. *Plant Mol Biol* 90(6):537–548.
- Rudresh DL, Shivaprakash MK, Prasad RD (2005) Effect of combined application of *Rhizobium*, phosphate solubilizing bacterium and *Trichoderma* spp. on growth, nutrient uptake and yield of chickpea (*Cicer aritenium* L.) *Appl Soil Ecol* 28(2):139–146
- Ryu C-M (2004) Bacterial volatiles induce systemic resistance in *Arabidopsis*. *Plant Physiol* 134(3):1017–1026
- Ryu C-M, Farag M, Hu C-H, Reddy MS, Wei H-X, Paré PW, Kloepper JW (2003) Bacterial volatiles promote growth in *Arabidopsis*. *Proc Nat Acad Sci* 100(8):4927–4932.
- Ryu CM, Choi HK, Lee CH, Murphy JF, Lee JK, Kloepper JW (2013) Modulation of quorum sensing in acyl-homoserine lactone-producing or -degrading tobacco plants leads to alteration of induced systemic resistance elicited by the rhizobacterium *Serratia marcescens* 90–166. *Plant Pathol J* 29(2):182–192.
- Sabra W, Dietz D, Tjahjajari D, Zeng A-P (2010) Biosystems analysis and engineering of microbial consortia for industrial biotechnology. *Eng Life Sci* 10(5):407–421.
- Santoro AE (2016) The do-it-all nitrifier. *Science* 351(6271):342–343.

- Sarma BK, Yadav SK, Singh S, Singh HB (2015) Microbial consortium mediated plant defense against phytopathogens: readdressing for enhancing efficacy. *Soil Biol Biochem* 87:25–33
- Sarvaiya N, Kothari V (2015) Effect of audible sound in form of music on microbial growth and production of certain important metabolites. *Microbiol* 84(2):227–235
- Schmidt R, Cordovez V, de Boer W, Raaijmakers J, Garbeva P (2015) Volatile affairs in microbial interactions. *ISME J* 9(11):1–7
- Schnider-Keel U, Seematter A, Maurhofer M, Blumer C, Duffy B, Gigot-Bonnefoy C, Keel C (2000) Autoinduction of 2,4-diacetylphloroglucinol biosynthesis in the biocontrol agent *Pseudomonas fluorescens* CHA0 and repression by the bacterial metabolites salicylate and pyoluteorin. *J Bacteriol* 182(5):1215–1225.
- Schuhegger R, Ihring A, Gantner S, Bahnweg G, Knappe C, Vogt G, Hutzler P, Schmid M, Van Breusegem F, Eberl L, Hartmann A, Langebartels C (2006) Induction of systemic resistance in tomato by N-acyl-L-homoserine lactone-producing rhizosphere bacteria. *Plant Cell Environ* 29(5):909–918
- Sharma S, Gupta R, Dugar G, Srivastava AK (2012) Impact of application of biofertilizers on soil structure and resident microbial community structure and function. *Bacteria in agrobiolgy: plant probiotics*. 65–77.
- Shong J, Jimenez Diaz MR, Collins CH (2012) Towards synthetic microbial consortia for bioprocessing. *Curr Opin Biotechnol* 23(5):798–802.
- Singh S, Kapoor KK (1999) Inoculation with phosphate-solubilizing microorganisms and a vesicular-arbuscular mycorrhizal fungus improves dry matter yield and nutrient uptake by wheat grown in a sandy soil. *Biol Fertil Soil* 28(2):139–144
- Singh S, Gupta R, Sharma S (2015) Effects of chemical and biological pesticides on plant growth parameters and rhizospheric bacterial community structure in *Vigna radiata*. *J Hazard Mater* 291:102–110
- Smith J (2001) The social evolution of bacterial pathogenesis. *Proc R Soc Lond B Biol Sci* 268(1462):61–69.
- Smith RP (2011) Design principles and applications of engineered microbial consortia. *Acta Hort* 905:63–69
- Smyth EM, McCarthy J, Nevin R, Khan MR, Dow JM, O’Gara F, Doohan FM (2011) In vitro analyses are not reliable predictors of the plant growth promotion capability of bacteria; a *Pseudomonas fluorescens* strain that promotes the growth and yield of wheat. *J Appl Microbiol* 111(3):683–692
- Solanki MK, Singh RK, Srivastava S, Kumar S, Kashyap PL, Srivastava AK (2015) Characterization of antagonistic-potential of two *Bacillus* strains and their biocontrol activity against *Rhizoctonia solani* in tomato. *J Basic Microb* 55(1):82–90.
- Srinivasan K, Mathivanan N (2009) Biological control of sunflower necrosis virus disease with powder and liquid formulations of plant growth promoting microbial consortia under field conditions. *Biol Control* 51(3):395–402.

- Supaphol S, Panichsakpatana S, Trakulnaleamsai S, Tungkananuruk N, Roughjanajirapa P, O'Donnell AG (2006) The selection of mixed microbial inocula in environmental biotechnology: example using petroleum contaminated tropical soils. *J Microbiol Meth* 65(3):432–441
- Tanouchi Y, Smith R, You L (2012) Engineering microbial systems to explore ecological and evolutionary dynamics. *Curr Opin Biotechnol* 23(5):791–797.
- Thomashow LS (2016) Induced systemic resistance: a delicate balance. *Environ Microbiol Rep* 8(5):560–563.
- Thomashow LS, Weller DM (1988) Role of a phenazine antibiotic from *Pseudomonas fluorescens* in biological control of *Gaeumannomyces graminis var. tritici*. *J Bacteriol* 170(8):3499–3508
- Thomashow LS, Bonsall RF, Weller DM (1997) Antibiotic production by soil and rhizosphere microbes in situ. *Man Environ Microbiol* 509:1–24
- Thompson HM (1996) Interactions between pesticides; a review of reported effects and their implications for wildlife risk assessment. *Ecotoxicol Lond Engl* 5(2):59–81.
- Tran H, Ficke A, Asiimwe T, Höfte M, Raaijmakers JM (2007) Role of the cyclic lipopeptide massetolide A in biological control of *Phytophthora infestans* and in colonization of tomato plants by *Pseudomonas fluorescens*. *New Phytol* 175(4):731–742.
- Traxler MF, Kolter R (2015) Natural products in soil microbe interactions and evolution. *Nat Prod Rep* 32(7):956–970.
- Vacheron J, Desbrosses G, Bouffaud ML, Touraine B, Moëgne-Loccoz Y, Muller D, Legendre L, Wisniewski-Dyé F, Prigent-Combaret C (2013) Plant growth-promoting rhizobacteria and root system functioning. *Front Plant Sci* 4:356
- Vacheron J, Renoud S, Muller D, Babalola OO, Prigent-Combaret C (2015) Alleviation of abiotic and biotic stresses in plants by *Azospirillum*. *Handbook for Azospirillum: technical issues and protocols*. 333–365
- Vacheron J, Moëgne-Loccoz Y, Dubost A, Gonçalves-Martins M, Muller D, Prigent-Combaret C (2016) Fluorescent *Pseudomonas* strains with only few plant-beneficial properties are favored in the maize rhizosphere. *Front Plant Sci* 7:1212
- Van Der Heijden MGA, Bardgett RD, Van Straalen NM (2008) The unseen majority: soil microbes as drivers of plant diversity and productivity in terrestrial ecosystems. *Ecol Lett* 11(3):296–310.
- Venkataraman A, Rosenbaum MA, Werner JJ, Winans SC, Angenent LT (2014) Metabolite transfer with the fermentation product 2,3-butanediol enhances virulence by *Pseudomonas aeruginosa*. *ISME J* 8(6):1210–1220.
- Venturi V, Fuqua C (2013) Chemical signaling between plants and plantpathogenic bacteria. *Annu Rev Phytopathol* 51(1):17–37.
- Venturi V, Keel C (2016) Signaling in the rhizosphere. *Trends Plant Sci* 21(3):187–198.
- Vurukonda SSK, Vardharajula S, Shrivastava M, SkZ A (2016) Enhancement of drought stress tolerance in crops by plant growth promoting rhizobacteria. *Microbiol Res* 184: 13–24

- Wang C-J, Yang W, Wang C, Gu C, Niu D-D, Liu H-X, Wang Y-P, Guo J-H (2012) Induction of drought tolerance in cucumber plants by a consortium of three plant growth-promoting rhizobacterium strains. *PLoS One* 7(12):e52565.
- Wang HH, Mee MT, Church GM (2013) Chapter 17 - Applications of engineered synthetic ecosystems. In: Zhao H (ed) *Synthetic biology: tools and applications*. Elsevier, pp 317–325
- Ward BB (2013) Nitrification. *Reference module in earth systems and environmental sciences*.
- Waters CM, Bassler BL (2005) Quorum sensing: communication in bacteria. *Annu Rev Cell Dev Biol* 21(1):319–346
- Watnick P, Kolter R (2000) Biofilm, city of microbes. *J Bacteriol* 182(10): 2675–2679
- Weidner S, Latz E, Agaras BC, Valverde C, Jousset A (2016) Protozoa stimulate the plant beneficial activity of rhizospheric pseudomonads. *Plant Soil* 410:509–515
- West SA, Cooper GA (2016) Division of labour in microorganisms: an evolutionary perspective. *Nat Rev Microbiol*. 14(11): 716–723
- West SA, Griffin AS, Gardner A, Diggle SP (2006) Social evolution theory for microorganisms. *Nat Rev Microbiol* 4(8): 597–607.
- West SA, Diggle SP, Buckling A, Gardner A, Griffin AS (2007a) The social lives of microbes. *Annu Rev Ecol Evol Syst* 38(1):53–77.
- West SA, Griffin AS, Gardner A (2007b) Evolutionary explanations for cooperation. *Curr Biol* 17(16): R661–R672
- Wu SC, Cao ZH, Li ZG, Cheung KC, Wong MH (2005) Effects of biofertilizer containing N-fixer, P and K solubilizers and AM fungi on maize growth: a greenhouse trial. *Geoderma* 125(1):155–166
- Zaidi A, Khan MS, Aamil M (2004) Bioassociative effect of rhizospheric microorganisms on growth, yield, and nutrient uptake of greengram. *J Plant Nutr* 27(4):601–612
- Zhang C, Sheng C, Wang W, Hu H, Peng H, Zhang X (2015) Identification of the lomofungin biosynthesis gene cluster and associated flavin-dependent monooxygenase gene in *Streptomyces lomondensis* S015. *PLoS One* 10(8):1–15
- Zhang L, Xu M, Liu Y, Zhang F, Hodge A, Feng G (2016) Carbon and phosphorus exchange may enable cooperation between an arbuscular mycorrhizal fungus and a phosphate-solubilizing bacterium. *New Phytol* 210(3):1022–1032.

Chapitre 2 : Analyse
métabolomique de l'impact du
mode de vie des *Pseudomonas* sur la
production de métabolites
secondaires

Préambule

Comme décrit dans la seconde partie de cette partie bibliographique, les micro-organismes vivent majoritairement au sein de communautés complexes (Prigent-Combaret *et al.*, 2012). La mise en place de ces communautés s'accompagne dans la majorité des cas de production de matrice extracellulaire et de formation de biofilm (Flemming *et al.* 2016). Le biofilm constitue le mode de vie préférentiel de bactéries dans la rhizosphère et est étroitement lié avec la notion de colonisation (Al-Ali *et al.* 2017). Ce mode de vie peut avoir une influence importante sur leur physiologie et sur l'expression de leur fonctions phytobénéfiques (Pandini *et al.* 2017). Néanmoins, la caractérisation des modifications physiologiques et l'impact du mode vie sur le métabolisme secondaires des bactéries rhizosphériques reste encore relativement inconnue (Pandini *et al.* 2017).

Les souches de *Pseudomonas* rhizosphérique intégrées dans cette études présentes de nombreuse fonctions phytobénéfiques (introduction, Vacheron *et al.* 2016) et sont capables de promouvoir la santé de la plante. Au cours de ce chapitre, nous avons recherché plus précisément les gènes pouvant être impliqués dans la production de métabolites secondaires connus et inconnus pouvant être produits par les souches *P. kilonensis* F113, *P. chlororaphis* JV479 et JV395B et *P. koreensis* JV222. Cette première approche génomique nous a permis de décrire les capacités métaboliques des souches. Nous avons ensuite développé une approche métabolomique dans l'objectif d'analyser l'impact du mode de vie sur le métabolome des *Pseudomonas* et sur la production de métabolites secondaires impliqués dans leur activité phytobénéfique.

Ce travail a été accepté pour être publié dans le journal *Microbial Biotechnology*

Secondary metabolites from plant-associated *Pseudomonas* are overproduced in biofilm

Laura Rieusset¹, Marjolaine Rey¹, Daniel Muller¹, Jordan Vacheron², Florence Gerin¹, Audrey Dubost¹, Gilles Comte¹, Claire Prigent-Combaret^{1*}

¹ Université de Lyon, Université Claude Bernard Lyon1, Ecologie Microbienne, CNRS UMR-5557, INRAe UMR-1418, VetAgroSup, 43 Boulevard du 11 novembre 1918, 69622 Villeurbanne, France

² Department of Fundamental Microbiology, University of Lausanne, 1015 Lausanne, Switzerland

Running title: *Pseudomonas* lifestyle and secondary metabolism

Published in *Microbial Biotechnology*

DOI:10.1111/1751-7915.13598

*Corresponding author: UMR CNRS 5557 Ecologie Microbienne, Université Lyon 1, 43 bd du 11 Novembre 1918, 69622 Villeurbanne cedex, France. Phone +33 4 72 43 13 49. E-mail: claire.prigent-combaret@univ-lyon1.fr

Abstract

Plant rhizosphere soil houses complex microbial communities in which microorganisms are often involved in intra-species as well as inter-species and inter-kingdom signalling networks. Some members of these networks can improve plant health thanks to an important diversity of bioactive secondary metabolites. In this competitive environment, the ability to form biofilms may provide major advantages to microorganisms. With the aim of highlighting the impact of bacterial lifestyle on secondary metabolites production, we performed a metabolomic analysis on four fluorescent *Pseudomonas* strains cultivated in planktonic and biofilm colony conditions. The untargeted metabolomic analysis led to the detection of hundreds of secondary metabolites in culture extracts. Comparison between biofilm and planktonic conditions showed that bacterial lifestyle is a key factor influencing *Pseudomonas* metabolome. More than 50% of the detected metabolites were differentially produced according to planktonic or biofilm lifestyles, with the four *Pseudomonas* strains overproducing several secondary metabolites in biofilm conditions. In parallel, metabolomic analysis associated with genomic prediction and a molecular networking approach enabled us to evaluate the impact of bacterial lifestyle on chemically-identified secondary metabolites, more precisely involved in microbial interactions and plant-growth promotion. Notably, this work highlights the major effect of biofilm lifestyle on acyl-homoserine lactone and phenazine production in *P. chlororaphis* strains.

Keywords: *Pseudomonas*, biofilm, secondary metabolites, bacterial lifestyle, metabolomic, genome mining, molecular networking, rhizosphere

Introduction

Plant roots exudate in the rhizosphere, the soil area under root influence, a wide diversity of chemical compounds (Haichar *et al.*, 2014). Most of these compounds attract microorganisms and promote their growth (Danhorn and Fuqua, 2007). The microbial community associated to the plant roots is known as the rhizo-microbiota (Brink, 2016). Within this rhizo-microbiota, some microorganisms can promote plant growth and protect plants against pathogens, thanks to several indirect or direct mechanisms (Vacheron *et al.*, 2013). To express their plant beneficial properties, bacteria have to be competitive and able to colonize the surface of plant tissues (Vacheron *et al.*, 2013). They are able to form biofilms on the plant roots inside the rhizosphere, as well as on soil particles, or on fungal mycelium (Ramey *et al.*, 2004). The ability to form biofilm is an advantage for microorganisms to be competitive in the rhizosphere (Pandini *et al.*, 2017). Biofilms can be described as aggregates of micro-organisms, generally embedded in an extracellular matrix and adhering to living or inert surfaces. This sessile mode constitutes the preferential lifestyle of microorganisms (Prigent-Combaret *et al.*, 2012). Biofilm formation is a dynamic process and relies on multiple biotic and abiotic factors such as nutrient availability, secretion of extracellular material and social competition (Flemming *et al.*, 2016). By providing a micro-environment where the diffusion of compounds is limited within the matrix, the biofilm facilitates intercellular signaling. Given the properties of the extracellular matrix and the facilitated interactions between the microorganisms, the biofilm lifestyle is clearly different from the lifestyle of planktonic cells (Prigent-Combaret *et al.*, 1999). New properties can emerge in biofilms that cannot be predictable from studies on free living organisms (Pandini *et al.*, 2017). In the rhizosphere, biofilm lifestyle plays a key role in plant-bacteria and bacteria-bacteria interactions and triggers the expression of plant beneficial properties by beneficial bacteria (Al-Ali *et al.* 2017; Besset-Manzoni *et al.* 2018).

The fluorescent *Pseudomonas* group regroups a wide diversity of rhizosphere plant-beneficial bacteria that can colonize the rhizosphere of different plant species and form biofilm (Noirot-Gros *et al.*, 2018). They can interact with various host plants and protect them against pathogens thanks to the biosynthesis of antimicrobial products like 2,4-diacetylphloroglucinol (DAPG), phenazines, pyrrolnitrin or alkyl-resorcinol (Couillerot *et al.*, 2009; Gross and Lopper, 2009; Vacheron *et al.*, 2013). They also promote plant growth through the modulation of plant hormonal pathways (Brazelton *et al.*, 2008). Genome mining allows to predict the ability of

strains to produce bioactive secondary metabolites (Loper *et al.*, 2012; Oni *et al.*, 2015). But genome mining does not take into account the biotic or abiotic factors that can influence the rhizobacterial production of secondary metabolites. Indeed, metabolites constitute the final product of gene expression and their production may depend on a myriad of external factors (Wolfender *et al.*, 2013). Innovation in analytical chemistry and the development of metabolomics enable to study large sets of metabolites actually produced by micro-organisms in biological samples, making it possible to correlate metabolite production to microbial physiology (Favre *et al.*, 2017).

In this study, we applied a metabolomics approach to evaluate if part of the metabolome of *Pseudomonas* strains differs according to biofilm or planktonic lifestyle. Metabolome of a given strain is defined as all metabolites produced by this strain at a given time. Here, regarding our analytical workflow, our study focused on secondary metabolites with molecular masses lower than 1000 Da, but may also include some primary metabolites. *Pseudomonas* strains considered in this study were *P. koreensis* JV222, *P. chlororaphis* JV395B and *P. chlororaphis* JV497 isolated from soil or maize roots as well as *P. kilonensis* F113 isolated from sugarbeet rhizosphere (Shanahan *et al.*, 1992; Vacheron *et al.*, 2016). The metabolomics approach developed in this study allows us to (i) detect compounds predicted by genome mining in the 4 *Pseudomonas* genomes and to (ii) highlight the important diversity of unknown compounds produced by *Pseudomonas* strains. Our results showed that bacterial lifestyle constitutes a key factor that influences the production of secondary metabolites in the four studied *Pseudomonas* strains. We found that more than 50% of the detected compounds are differentially produced according to the lifestyle of the bacteria and that the majority of *Pseudomonas* secondary metabolites are overproduced in biofilm colony. Uncharacterized compounds as well as secondary metabolites involved in bacterial biotic interactions like acyl-homoserine-lactones (AHL) or phenazines are strongly influenced by biofilm lifestyle.

Results and discussion

The 4 Pseudomonas strains are able to form biofilms on wheat roots

First, the ability of the 4 studied strains to colonize and form biofilms on plant roots was studied. Root colonization of wheat was analysed 7 days after inoculation of each *Pseudomonas* strain on 2 wheat cultivars, Adular and Bordeaux. Confocal laser scanning microscopic observations and fluorescence colonization quantification showed that all *Pseudomonas* strains are able to colonize wheat roots (Fig. 1). The 4 *Pseudomonas* strains formed small or thick aggregates of cells throughout the root system and appeared as good wheat colonizers, as already reported for F113 (Valente *et al.*, 2020).

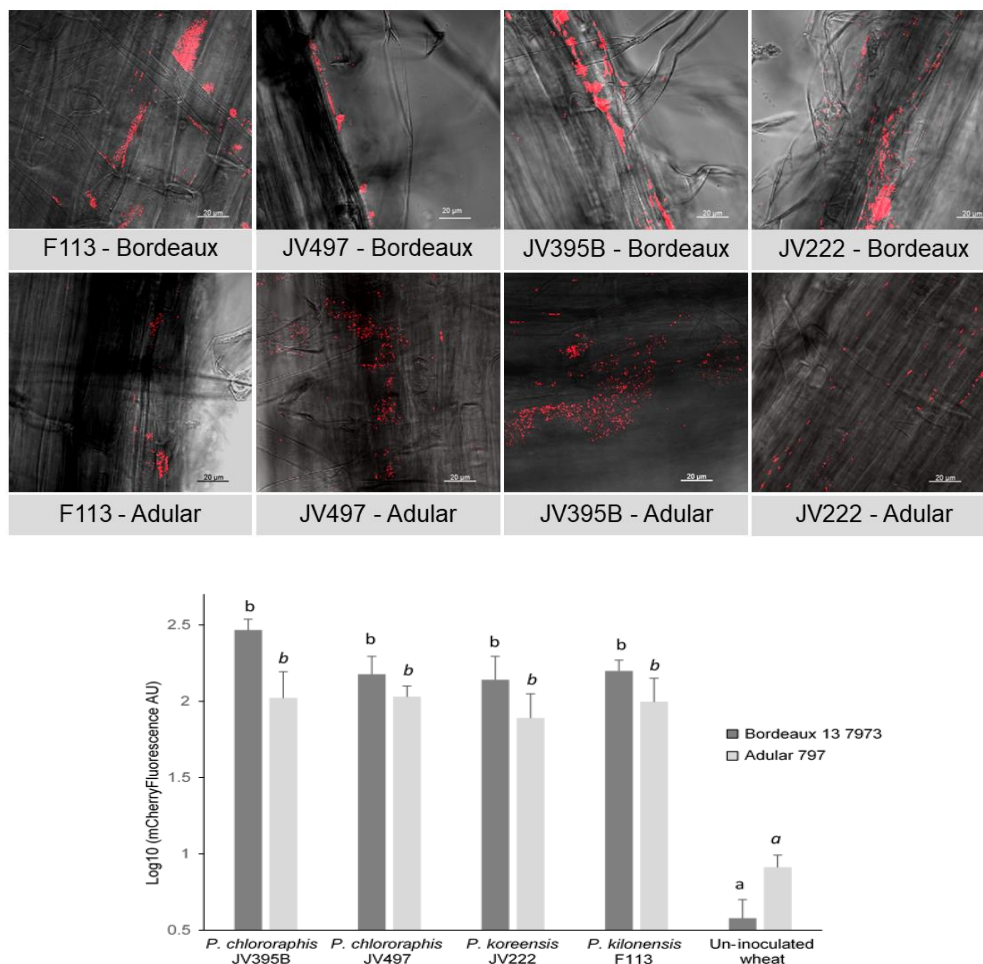


Figure 1. Confocal laser microscopy images (A) and semi-quantitative analysis (B) of root colonization by *P. kilonensis* F113, *P. chlororaphis* JV497 and JV395B and *P. koreensis* JV222 on wheat genotypes Bordeaux 13 7973 and Adular 797, 7 days after bacterial inoculation. Photographs (A) were taken using a confocal laser scanning microscope with an excitation of 561 nm and an emission filter of 570-636nm.

Cells expressing mCherry are red and grey backgrounds correspond to root views observed with transmitted light. Images are representative of the analysis of 15 images per condition. Scale bars measure 20 μm . Root colonization (B) was estimated by quantifying the mCherry fluorescence recovered from roots, with an Infinite M200 PRO microplate reader using an excitation wavelength of 587 nm, and an emission wavelength of 661 nm. For all strains, significant higher levels of fluorescence were measured in the inoculated plants than in the un-inoculated plants (Kruskall and Wallis test, P -value < 0.05; different letters indicate significant differences).

Numerous potential biosynthesis pathways of secondary metabolites were evidenced in the 4 root-colonizing *Pseudomonas* strains by genome mining

To predict the putative biosynthesis pathways of *Pseudomonas* secondary metabolites shared by the 4 *Pseudomonas* strains, their genomes were screened using AntiSMASH and by implementing BLASTp search with ORFs involved in the biosynthesis of secondary metabolites produced by model strains of *Pseudomonas* (Table 1). Genome mining revealed that the 4 *Pseudomonas* strains harbour 20 gene clusters coding for the biosynthesis of bioactive secondary metabolites, some being involved in plant stimulation or biocontrol properties.

Table 1: Secondary metabolites and corresponding gene clusters of *Pseudomonas* strain

Secondary metabolites	Gene involved in biosynthesis	Reference strain [†]	Locus number	JV222	JV395B	JV497	F113
ANTIMICROBIAL COMPOUNDS							
2,4-diacetylphloroglucinol (DAPG)	<i>phlIEDBCAFGH</i>	<i>P. kilonensis</i> F113	PSF113_2457-2464				X
		<i>P. kilonensis</i> F113	PSF113_2367-2369				X
Hydrogen cyanide (HCN)	<i>hcnABC</i>	<i>P. chlororaphis</i> subsp. aureofaciens 30-84	JV395B_v1_740005-740007		X		
			JV497_v1_90035-90037			X	
		<i>Pseudomonas fluorescens</i> Pf0-1	JV222_v1_460055-460057	X			
Pyrrrolnitrin	<i>prnDCBA</i>	<i>P. chlororaphis</i> subsp. aureofaciens 30-84	JV497_v1_130011-130014				X
			JV395B_v1_1150076-1150079		X		
Phenazine	<i>phzIRABCABFD + phzH</i>	<i>P. chlororaphis</i> subsp. aurantiaca Pcho10	JV497_v1_250066-250076				X
	<i>phzIRABCABFD + phzO</i>	<i>P. chlororaphis</i> subsp. aureofaciens 30-84	JV395B_v1_1530032-1530043		X		
Alkylresorcinol	<i>darR; darCBA</i>	<i>P. chlororaphis</i> subsp. aureofaciens 30-84	JV497_v1_210011-210015				X
			JV395B_v1_120011;v1_128003-1280005		X		
Putative Lankacidin	<i>lkcABCDEFGJ; pqqFABCDEG</i>	<i>P. kilonensis</i> F113	PSF113_3657-3666; PSF113_5383-5388				X
QUORUM SENSING RELATED COMPOUNDS							
Homoserine lactone	<i>phzI/phzR</i>	<i>P. chlororaphis</i> subsp. aureofaciens 30-84	JV497_v1_250066-250067				X
			JV395B_v1_1530032-1530033		X		
	<i>csaI/csaR</i>	<i>P. chlororaphis</i> subsp. aureofaciens 30-84	JV497_v1_100065-100066				X
			JV395B_v1_760017-760018		X		
	<i>aurI/aurR</i>	<i>P. chlororaphis</i> subsp. aurantiaca StFRB508	JV395B_v1_1510126-1510127		X		
AUXIN COMPOUNDS							

Auxin	<i>iaaM</i>	<i>Pseudomonas moraviensis</i> R28-S	JV222_v1_690002	X	
	<i>iaaM</i>	<i>P. chlororaphis</i> subsp. aureofaciens 30-84	JV497_v1_320416 JV395B_v1_1150001	X	X
	<i>iaaM; amiE</i>	<i>P. kilonensis</i> F113	PSF113_5381; PSF113_2053		X
SIDEROPHORE TYPE COMPOUNDS					
Pyridine-2,6-thiocarboxylic acid (PDTC)	<i>pdtCKPELMFGHIJON</i>	<i>P. kilonensis</i> F113	PSF113_2605-2618		X
	<i>pvdSL; pvdIJKDEONMP; fpvl; pvdA</i>	<i>P. kilonensis</i> F113	PSF113_1749-1750; PSF113_1836-1847; PSF113_1856-1860		X
Pyoverdine	<i>pvdSL; pvdLY; pvdAPMNOFEJID</i>	<i>P. chlororaphis</i> subsp. aureofaciens 30-84	JV395B_v1_1300021-1300023; JV395B_v1_1250001-1270001 JV497_v1_201066-201068; JV497_v1_200106-210003	X	X
	<i>pvdLS; pvdG-pvdJ-pvdO-pvdP; pvdQfecR; fpvlpvdA</i>	<i>Pseudomonas moraviensis</i> R28-S	JV222_v1_510035-510036; JV222_v1_260099-260112; JV222_v1_330053-330053; JV222_v1_270006-270007	X	
	<i>cbrDCBA; acsABC; yhcA; acsEDF</i>	<i>P. chlororaphis</i> subsp. aureofaciens 30-84	JV395B_v1_3258027-3277011 JV497_v1_3351885-3370875	X	X

OTHER ANTISMASH PKS AND NRPS PREDICTION (AntiSMASH)						
Compounds	MIBiG	Locus number	JV222	JV395B	JV497	F113
NRP1	-	JV395B_v1_910035		X		
		JV497_v1_120137			X	
NRP2	-	JV395B_v1_800032-800033		X		
NRP3	-	JV497_v1_120298			X	
NRP4	BGC0001135	JV222_v1_330154-330156	X			
NRP5	-	JV222_v1_260096-260103	X			
NRP6	BGC0000438	JV222_v1_3100040-310042	X			
		JV222_v1_30009	X			
		JV395B_v1_10008		X		
NRP7-like	BGC0000387	JV497_v1_10007			X	
		PSF113_0201				X
		JV395B_v1_90058-90061		X		
PK1	BGC0000837	JV497_v1_30101-30107			X	
		JV222_v1_100073-100076	X			
		PSF113_0458-0461				X
PK2	Butyrolactone	PSF113_3047-3048				X

† Annotation of BGCs for F113 was performed according to Redondo-Nieto *et al.* (2013). For *P. chlororaphis* strains JV395B and JV497, annotation was made by comparison (coverage > 80%; identity > 80%) with protein sequences of the reference strains *P. chlororaphis* subsp. *aureofaciens* 30-84 (Loper *et al.*, 2012), *P. chlororaphis* subsp. *aurantiaca* Pcho10 (Hu *et al.*, 2014) or StFRB508 (Morohoshi *et al.*, 2013). For *P. koreensis* JV222, *Pseudomonas moraviensis* R28-S (Hunter *et al.*, 2014) or *Pseudomonas fluorescens* Pf0-1 (Silby *et al.* 2009) were used.

Indeed, all strains share biosynthetic gene clusters (BGCs) involved in the production of indolic compounds involved in root development like auxin derivatives, the volatile antimicrobial compound hydrogen cyanide (HCN) and pyoverdine (Table 1).

P. kilonensis F113 possesses *pdt* genes encoding the production of another siderophore, the pyridine-2,6-thiocarboxylic acid (PDTC, Table 1) (Redondo-Nieto *et al.*, 2013). PDTC can chelate several metals other than iron (Zawadzka *et al.*, 2006) and may protect F113 from the toxic effects of metals (Cortese *et al.*, 2002), but its potential role in the rhizosphere

fitness of F113 has never been established. F113 also harbours BGCs for the biosynthesis of the antimicrobial compounds lankacidin (*lkc* genes) and 2,4-diacetylphloroglucinol (DAPG; *phl* genes). The *phl* operon is absent in the *P. chlororaphis* and *P. koreensis* strains (Table 1). This result is consistent with a previous phylogenetic study (Almario *et al.*, 2017). DAPG has a large spectrum of antimicrobial properties against bacteria, fungi, and helminths (Couillerot *et al.*, 2009). At low concentrations, it has signalling properties on host plant (Brazelton *et al.*, 2008) or other bacteria (Combes-Meynet *et al.*, 2011).

The two *P. chlororaphis* strains, JV395B and JV497 share similar genetic clusters for the biosynthesis of pyrrolnitrin, phenazine and alkylresorcinol and of the siderophores, pyoverdine and achromobactin (Table 1). One difference between the two *P. chlororaphis* strains concerns the end of their phenazine BGCs where *phzH* for JV497 and *phzO* for JV395B are present. This difference may lead to the synthesis of different phenazine derivatives. *phzO* encodes a monooxygenase (Yu *et al.*, 2018) leading to the production of hydroxylate derivatives of the PCA (2-OH-PCA, 2-OH-PHZ and putative di-OH-PCA; Maddula *et al.*, 2008) whereas *phzH* encodes a transamidase transforming PCA into phenazine-1-carboxamide (PCN) (Price-Welan *et al.*, 2006). Phenazines represent a large class of natural antibiotics that exhibit broad-spectrum antibiotic activity (Mavrodi *et al.*, 2006). Their production is a primary mechanism involved into pathogen inhibition and contributes also to *P. chlororaphis* rhizosphere colonization and establishment (Mazzola *et al.*, 1992). Unlike *P. kilonensis* and *P. koreensis*, the *P. chlororaphis* strains (JV395B and JV497) possess in their genomes the Quorum Sensing (QS) regulation genes *phzI/phzR* and *csaI/csaR*. JV395B owns a third QS regulation system *aurI/aurR* that is absent in JV497 genome (Table 1). These three QS systems take part in different regulation systems; *phzI/phzR* and *aurI/aurR* are implicated in phenazine biosynthesis regulation (Maddula *et al.*, 2008; Morohoshi *et al.*, 2017) whereas *csaI/csaR* controls the production of bacterial cell surface properties (Zhang *et al.*, 2001; Maddula *et al.*, 2006).

AntiSMASH analysis allowed the detection of other Non-Ribosomal Peptide Synthases (NRPS) and Polyketide synthases (PKS) in every strain (Table 1), but in-depth investigation on these BGCs does not allow to clearly identify the compounds synthesised. However, NRPS involved in the synthesis of putative syringopeptin (BGC0000438) and bicornutin (BGC0001135) were identified in strain JV222, putative butyrolactone in F113, mangotoxin (BGC0000387) and arylpropylene (BGC0000837) in all strains.

Metabolomes of *Pseudomonas* strains differ according to biofilm and planktonic lifestyles.

After having evidenced the ability of the four plant-associated *Pseudomonas* to form biofilms on wheat roots, a portion of metabolomes (i.e. compounds <1000 Da) of the four *Pseudomonas* strains were compared between biofilm and planktonic cultures. Secondary metabolites constitute the major part of the metabolome of an organism and generally greatly exceed the number of primary metabolites (Moco et al. 2007). They are involved in the adaptation of organisms to their biotic and abiotic environment (Demain et al. 2000). The analytical setup developed in this study was focused on small metabolites and allowed detection of hundreds of compounds. Multivariate analysis was conducted on data obtained in negative and positive ionisation modes (Fig. 2A and 2B); this allows the detection of different molecules regarding their atomic composition and chemical structure (Dettmer *et al.*, 2007).

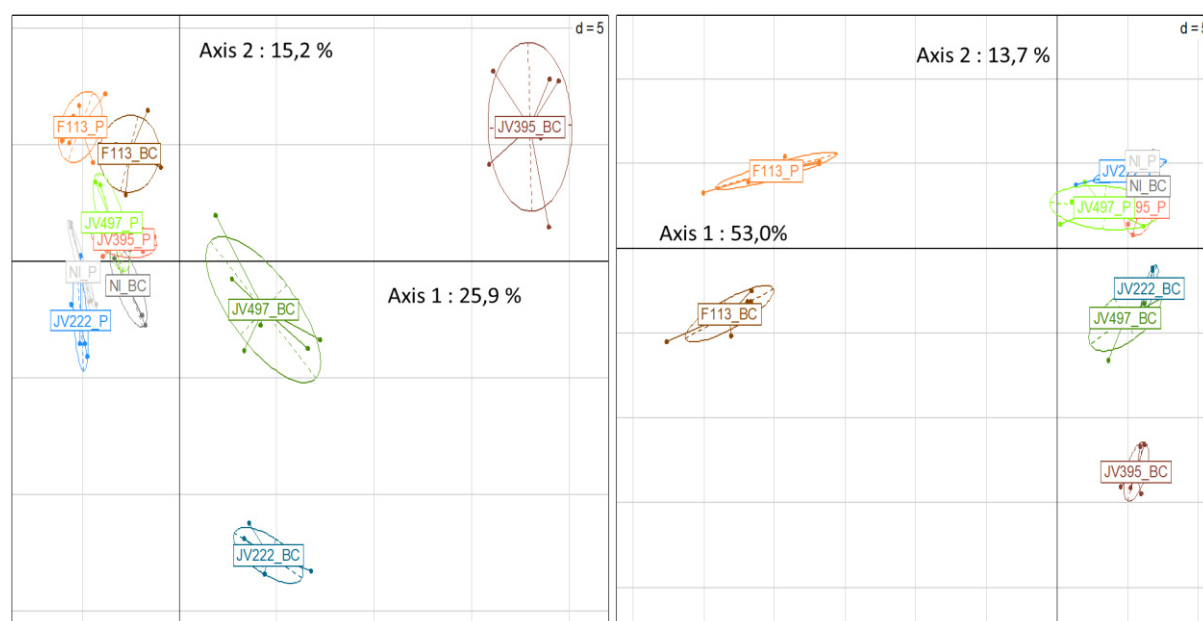


Figure 2. Principal component analysis of LC–HRMS data obtained for the four *Pseudomonas* strains cultivated in planktonic (P) or in biofilm-colony (BC) conditions after 6 days of incubation, based on intensity of ions (expressed in log₁₀) in positive **(A)** and negative **(B)** modes. Relationships between metabolomes of the 4 fluorescent *Pseudomonas* strains, *P. chlororaphis* JV395B and JV497, *P. kilonensis* F113 and *P. koreensis* JV222, according to lifestyles are visualized along principal components PC1 = 25.9% and PC2 = 15.2% (N = 60 samples; 186 molecular ions) for the positive mode **(A)** and PC1 = 53.0% and PC2 = 13.7% (N = 60 samples; 230 molecular ions) for the negative mode **(B)**.

First, biological replicates from a same modality are clustered on the principal component analysis, revealing good repeatability. Second, in positive detection mode (Fig. 2A), axis 1, which represents 25.9% of the data variability, separated all strains according to their bacterial lifestyle, specifically for *P. chlororaphis* JV395B, *P. chlororaphis* JV497 and *P. koreensis* JV222. Axis 2, which represents 15.2% of the variability, separated strains from biofilm colony between each other. The *P. kilonensis* F113 strain was the only one that could be separated from the other strains in the planktonic lifestyle. Third, in the negative detection mode, *P. kilonensis* F113 (from biofilm and planktonic cultures) was separated from the other strains according to axis 1 (53%), suggesting that F113 can produce discriminant compounds, different from other strains (Fig. 2B). Axis 2, which represents 13.7% of the variability, separated each strain according to planktonic and biofilm colony lifestyle, as similarly observed for the positive ionisation mode (Fig. 2A). Thus, in both ionisation modes, strains were separated according to their lifestyle. Thus, metabolomes of the 4 studied *Pseudomonas* strains are strongly influenced by bacterial lifestyle. Moreover, strains separation was much more important in biofilm colony than in planktonic lifestyle especially for *P. koreensis* JV222, *P. chlororaphis* JV395B and *P. chlororaphis* JV497, indicating that these strains produce more specialized metabolites in biofilm. Several studies have previously shown that the physiology of bacterial cells differs between biofilm and planktonic lifestyles using transcriptomic (Waite *et al.*, 2005), proteomic (Mikkelsen *et al.*, 2006; Favre *et al.*, 2018) or metabolomics approaches (Gjersing *et al.*, 2007; Stipetic *et al.*, 2015; Favre *et al.*, 2018).

To compare bacterial secondary metabolites differentially produced by each strain according to the bacterial lifestyle conditions, univariate analyses were performed (Fig. 3). Ions detected in positive and negative ionisation modes were combined in order to have one ion per metabolite. Different behaviours were highlighted for every strain. For *P. kilonensis* F113, *P. koreensis* JV222 and *P. chlororaphis* JV395B, most of metabolites were significantly differentially produced between planktonic and biofilm colony lifestyle (61.3% of them for F113, 73.8% for JV395B and 76.6% for JV222) (Fig. 3A). *P. chlororaphis* JV395B and *P. koreensis* JV222 metabolomes were the most influenced by bacterial lifestyle (Fig. 3A) with more than half of their metabolites overproduced in biofilm. In *P. chlororaphis* JV497, only 38% of them were differentially produced between the tested conditions (Fig. 3A). But it is important to note that some of the most abundant compounds produced by *P. chlororaphis* JV497 were more produced in biofilm condition.

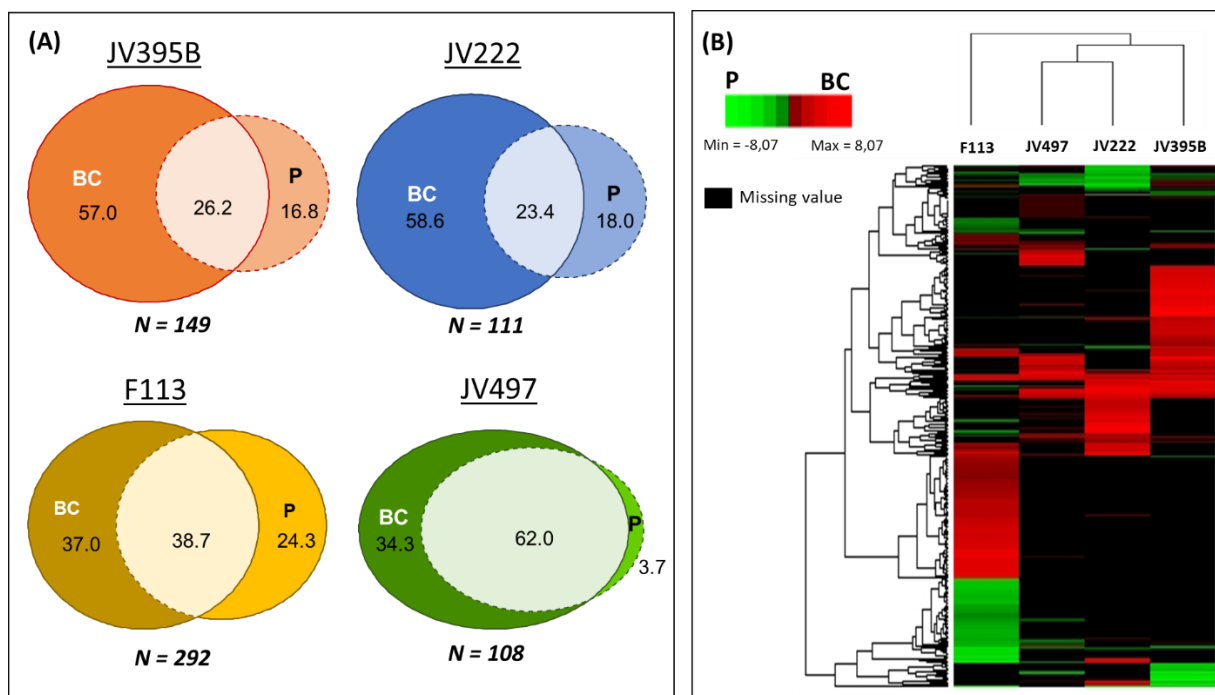


Figure 3. Venn diagrams representing the percentage of secondary metabolites significantly over-produced in biofilm-colony (BC), planktonic (P) or shared between the two culture modes for each *Pseudomonas* strains, *P. chlororaphis* JV395B and JV497, *P. kilonensis* F113 and *P. koreensis* JV222 (P-value < 0.05, Wilcoxon test) (A). Heatmap clustering of the secondary metabolites differentially-produced in biofilm-colony (red) or in planktonic (green) cultures (P-value < 0.05, Wilcoxon test) (B). The map was generated using log₂ fold-change values calculated from the metabolome table matrix constituted of 328 m/z features.

Thus, for every strain, most of the detected compounds presented higher intensity in biofilm than in planktonic culture (Fig. 3A and 3B). *P. koreensis* JV222, *P. chlororaphis* JV395B and *P. chlororaphis* JV497 produced much more metabolites with a significant higher amount in biofilm colony than in planktonic cultures (i.e. 3.3; 3.4 and 9.2 times more metabolites in biofilm, respectively) (Fig. 3A and 3B). For *P. kilonensis* F113, the difference was lower with only 1.5 times more metabolites overproduced in biofilm colony. The chemical diversity of the secondary metabolites differently-produced according to bacterial lifestyle is shown for every strain on a heat map (Fig. 3B). *P. chlororaphis* strains JV395B and JV497, and *P. koreensis* JV222 are clustered together, whereas *P. kilonensis* strain F113 is outside this cluster. Indeed, F113 showed discriminant metabolites BC from the other strains in both planktonic culture (green) and biofilm colony (red) (Fig. 3B).

Most Pseudomonas bioactive secondary metabolites whose BCGs were predicted by genome mining and molecular networking, are overproduced in biofilms

Bioactive secondary metabolites whose BCGs were predicted by genome mining, were sought in planktonic and biofilm cultures (Tables 1 and 2). Only thirty-eight metabolites could be annotated in the *Pseudomonas* biofilm and planktonic cultures (Table 2). While biosynthetic gene clusters involved in the production of different metabolites were predicted in genomes of the *Pseudomonas* strains (i.e. achromobactin, lankacidin, alkylresorcinol, HCN and pyoverdine), these compounds were not produced under the tested conditions, or were not detectable with our analytical method. To go further, a molecular networking (MN) approach was done on biofilm-produced secondary metabolites in order to cluster metabolites that share same MS/MS fragmentation (Watrous et al. 2012). MN evidenced 5 clusters that contain more than two metabolites (Fig. 4). The majority of biofilm-produced metabolites clustered on the MN are synthesized by the *P. chlororaphis* strains and belong to AHL and phenazine families (Fig. 4 and Table 2). Two other clusters (N°1 and N°2) consisting of 3 nodes correspond to unknown compounds produced by JV395B and contain the ions m/z 514.1526, 376.1297 and 358.1197 (cluster n°1), and 385.1917, 387.2076 and 361.1900 (cluster n°2). The last cluster (4 nodes) corresponds to lipophilic nitrogen compounds produced by F113 (Fig. 4 and Table 2). Four other clusters are constituted of only 2 metabolites that could not be assigned to a chemical family (Fig. 4). Finally, most of the ions not grouped in clusters were produced by only one strain confirming that the 4 strains had different metabolomes in biofilms (Fig. 2 and Fig. 4).

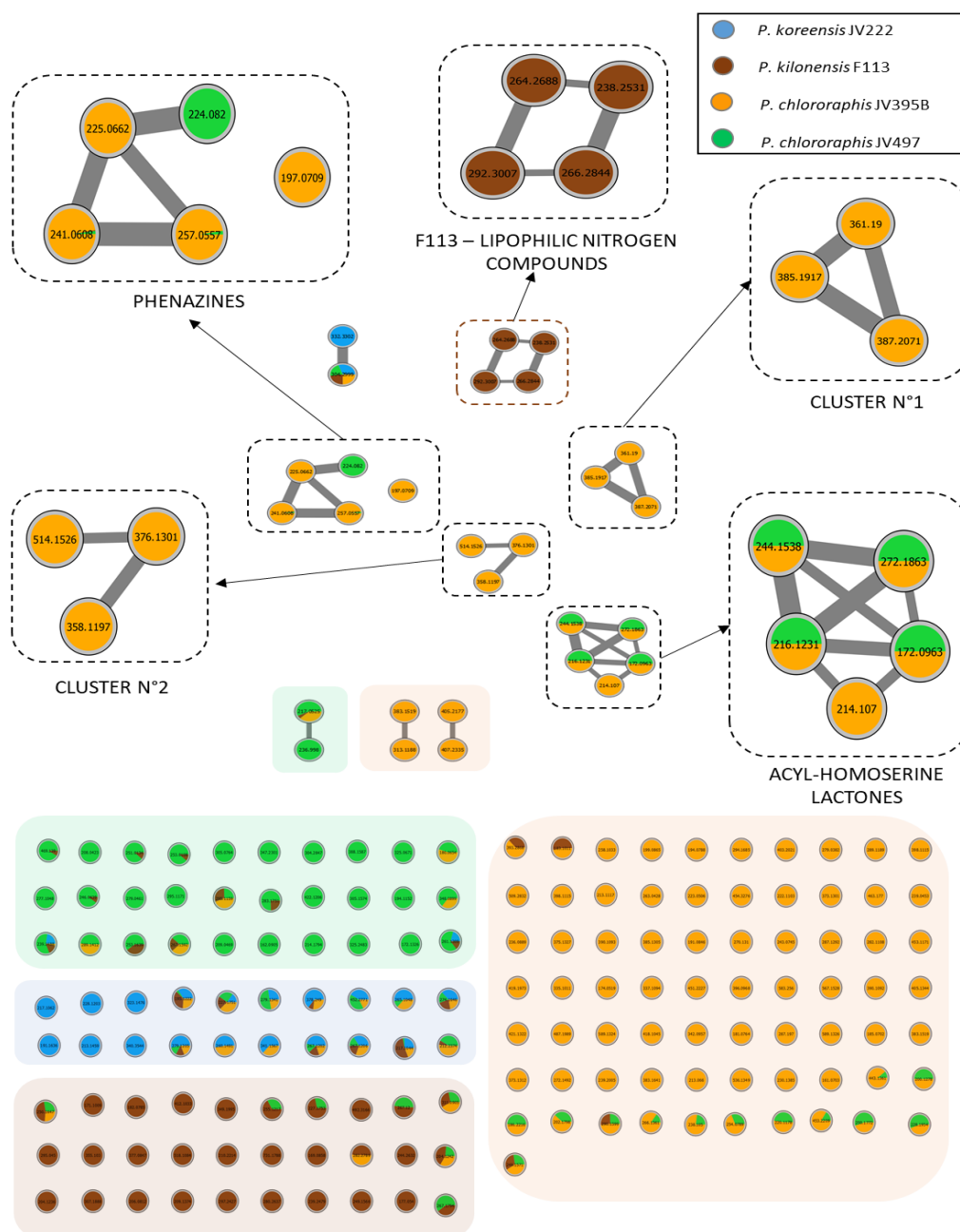


Figure 4. Molecular networks of MS/MS data obtained from biofilm cultures of the four bacterial strains *P. chlororaphis* JV395B (orange), *P. chlororaphis* JV497 (green), *P. kilonensis* F113 (brown) and *P. koreensis* JV222 (blue), using a cosine similarity cut-off of 0.6. Cluster position was determined according to t-distributed stochastic neighbour embedding (t-SNE) output. Nodes are labelled with parent m/z ratio. Relative proportion of the compounds belonging to each strain was represented as a pie chart in each node. This figure highlights that most single ions from the 4 *Pseudomonas* strains (i.e. *P. chlororaphis* JV395B (orange box), *P. chlororaphis* JV497 (green box), *P. kilonensis* F113 (brown box) and *P. koreensis* JV222 (blue box)) are unique to each strain. Clusters constituted of more than 3 ions are emphasized.

First, several metabolites were observed to be distinctly produced by the *Pseudomonas* strains but showed little difference between biofilm/planktonic lifestyle or were even repressed in biofilm conditions. DAPG, the monoacetylphloroglucinol (MAPG), and another putative compound that shared closed UV spectra and MS-MS fragmentation as DAPG were only detected in F113 culture (Table 2). These compounds were weakly or not influenced by bacterial lifestyle in *P. kilonensis* F113. DAPG production in fluorescent *Pseudomonas* strains is known to be regulated by other biotic factors like the presence of the bacterial predator *Acanthamoeba castellanii* (Jousset *et al.*, 2010) or plant compounds (de Werra *et al.*, 2008).

Indole-3-acetic acid (IAA) produced through *iaaM* in the studied *Pseudomonas* strains, was detected in *P. kilonensis* F113, *P. koreensis* JV222 and *P. chlororaphis* JV395B cultures but not in *P. chlororaphis* JV497 ones. IAA is the most abundant naturally occurring auxin, which is a class of phytohormones involved in the regulation of plant growth and development (Szkop and Bielawski 2013). IAA was produced in similar proportions independently of the bacterial lifestyle in F113 and JV222, whereas it was significantly more produced in planktonic culture than biofilm colony in JV395B. *P. koreensis* JV222 also produced indole-3-lactic acid in same proportions, in biofilm and planktonic cultures. IAA has been shown to stimulate the formation of bacterial biofilm at low concentrations whereas it has negative effect on biofilm formation at high concentrations (Plyuta *et al.*, 2013). Another indolic compound, the intracellular signal indole, also presents a discrepancy of effects on the control of biofilm formation depending on bacterial strains and concentration (Lee and Lee 2010). Thus, it is not surprising that IAA production is not similarly controlled according to bacterial lifestyle in the different *Pseudomonas* tested strains.

This analysis also led to the detection of thioester and acid derivatives of PDTC in *P. kilonensis* F113 cultures (Table 2), but these compounds were not significantly differentially produced in biofilm and planktonic cultures. Its biosynthetic gene cluster was predicted in F113 genome by Redondo-Nieto *et al.* in 2013 but the metabolite was never detected in F113 cultures. Compounds highlighted here were ester, thioester and acid derivatives of PDTC but not PDTC itself (Table 2; Fig. S2; Budzikiewicz *et al.*, 1981). PDTC is not stable in solution (Cortese *et al.* 2002), but the detection of PDTC derivatives in F113 cultures can suggest the potential ability of F113 to produce PDTC (Budzikievitz *et al.*, 2003).

The production of pyrrolnitrin, a compound with a strong antifungal activity *in vitro* (Selin *et al.*, 2010) known to be produced by some fluorescent *Pseudomonas* species like *P.*

chlorororaphis or *P. protegens*, was not significantly changed in *P. chlorororaphis* JV395B and JV497 according to the bacterial mode of life (Table 2). However, pyrrolnitrin derivatives are influenced by bacterial lifestyle. Putative aminopyrrolnitrin (i.e. pyrrolnitrin immediate precursor in the biosynthesis pathway) was significantly more produced by *P. chlorororaphis* JV395B in planktonic mode, while another pyrrolnitrin derivative (compound n° 22 in Table 2) was significantly more produced in biofilm in both *P. chlorororaphis* strains.

Second, among the thirty-eight annotated compounds twenty-five were observed clearly overproduced in biofilm cells. Five AHLs derivatives (i.e. C₄-homoserine lactone (HSL), 3-OH-C₆-HSL, C₆-HSL, 3-OH-C₈-HSL and 3-OH-C₁₀-HSL) were produced by both *P. chlorororaphis* strains; only 3-oxo-C₆-HSL was not produced by JV497 (Fig. 4), probably because JV497 does not possess the *aurI/aurR* regulation system that was strongly implicated in 3-oxo-C₆-HSL production (Morohoshi *et al.*, 2017). AHLs are signalling molecules released by bacteria in response to population size that induce the coordinated expression of specific genes when sensed by neighbouring cells (Keller and Surette, 2006; Flemming *et al.*, 2016). All AHL derivatives were overproduced in biofilm colony (Table 2), as commonly described in literature (Waite *et al.*, 2005). 3-OH-C₆-HSL was for instance 124 and 24 times more produced in biofilm colony than in planktonic cultures in *P. chlorororaphis* JV395B and *P. chlorororaphis* JV497, respectively. By providing a closed system in which signalling molecules can be concentrated, the biofilm is an environment that facilitates intercellular signalling, which may explain the observed higher AHL concentrations in *P. chlorororaphis* biofilm cultures (Charlton *et al.*, 2000; Flemming *et al.*, 2016). AHLs overproduction in biofilm may modify the physiology of bacterial cells, the biocontrol secondary metabolites they produce (particularly phenazines and pyrrolnitrin), and as a consequence their biotic interactions within the rhizosphere community (Venturi and Keel, 2016). This enhanced production may also directly impact the host plant, since AHL derivatives can directly interact with plant receptors and subsequently modify gene expression in plants (Schikora *et al.*, 2016; Besset-Manzoni *et al.*, 2018). Nevertheless, AHLs were probably not the only regulation system. Indeed, although JV222 and F113 shared a distinct metabolism according to bacterial lifestyle, no AHL derivatives was detected in their cultures. However, Laue *et al.* in 2000 described the presence of 3 AHLs (i.e. C₆-HSL, C₁₀-HSL, and 3OH-C_{14:1}-HSL) in *P. kilonensis* F113 supernatant fractions produced by HdtS, a putative novel *N*-acyl-homoserine lactone synthase, which does not belong to the LuxI or LuxM family of AHL synthases. Even though our protocol allowed the detection of AHLs in *P. chlorororaphis*

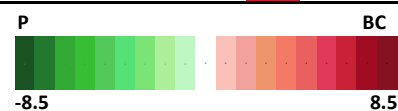
strains JV395B and JV497, none of the above-cited AHLs were detected in *P. kilonensis* F113 cultures under the tested conditions. In 2005, HdtS was rather described as a lysophosphatidate acyltransferase (LPA) and not as an AHL synthase (Cullinane *et al.*, 2005). It is conceivable that other cell density-dependent regulation systems than AHLs might be implicated in secondary metabolism regulation in F113 or JV222 biofilms.

Table 2. Chemical characterization of annotated secondary metabolites combined with heatmap representation of their differential production in planktonic or biofilm colony cultures.

N°	rt (min)	[M+H]	[M-H]	UV [†] (nm)	Formula	MSMS - fragmentation	Chemical compound / family	Foldchange (BC/P)†			
								F113	JV395B	JV222	JV497
Indolic compounds											
1	3.48	206.0812	204.0686	222; 278	C ₁₁ H ₁₁ NO ₃	a: 170.0589 ; 144.0783 ; 130.0659 ; 118.0645	Putative indole-3-lactic acid				ns
2	4.07	176.0507	174.9558	225; 278	C ₁₀ H ₉ NO ₂	a: 130.0652 ; 119.0479	Indol-3-acetic acid	ns	**		ns
Pyridine-2,6-thiocarboxylic acid (PDTC) derivatives											
3	3.40	196.0609	ND	ND	C ₉ H ₉ NO ₄	a: 162.65 ; 136.0391 ; 92.0502	Dimethyl 2,6-pyridinedicarboxylate	ns			
4	3.95	197.0380	ND	ND	C ₈ H ₈ N ₂ O ₂ S	a: 152.0153 ; 137.0525 ; 121.0398 ; 104.0136	2-Pyridinecarbothioic acid, 6-aminomethyl ester	ns			
5	5.70	212.0383	ND	ND	C ₉ H ₉ NO ₃ S	a: 179.0472 ; 152.0163 ; 136.0335 ; 124.0188	2-Pyridinecarboxylic acid, 6-methyl ester	ns			
6	7.07	228.0159	ND	ND	C ₉ H ₉ NO ₂ S ₂	a: 180.0096 ; 152.0163 ; 124.0202	Pyridine-2-6-di-S-methyl esters	ns			
Phloroglucinols											
7	3.58	169.0498	167.0321	228; 286; 333	C ₈ H ₈ O ₄	b: 151.0379; 123.0432	Monoacetylphloroglucinol	ns			
8	6.35	211.0604	209.0513	220; 270; 328	C ₁₀ H ₁₀ O ₅	b: 193.0196 ; 167.0339 ; 151.0085 ; 123.0493	2,4-diacetylphloroglucinol	*			
9	6.22	412.1045	410.0834	269; 328	ND	b: 366.0929 ; 209.0424 ; 167.0344 ; 151.0379	NI	*			
Acyl-homoserine-lactones (AHL)											
10	1.68	172.0963	ND	ND	C ₈ H ₁₃ NO ₃	a: 102.0551	C4-HSL	**			**
11	2.12	216.1231	ND	ND	C ₁₀ H ₁₇ NO ₄	a: 102.0553	3-OH-C6-HSL	**			**
12	2.33	214.1070	ND	ND	C ₁₀ H ₁₅ NO ₄	a: 102.0523	3-oxo-C6-HSL	**			
14	3.98	200.1287	ND	ND	C ₁₀ H ₁₇ NO ₃	a: 102.0542	C6-HSL	**			**
15	4.28	244.1538	ND	ND	C ₁₂ H ₂₁ NO ₄	a: 102.0544	3-OH-C8-HSL	**			**
16	6.03	272.1863	ND	ND	C ₁₄ H ₂₅ NO ₄	a: 102.0546	3-OH-C10-HSL	**			**
Phenazines											
17	4.50	197.0709	ND	230; 255; 364; 421	C ₁₂ H ₈ N ₂ O	a: 179.0584 ; 169.0751	Hydroxyphenazine	**			
18	4.68	257.0557	ND	241; 262; 400; 466	C ₁₃ H ₈ N ₂ O ₄	a: 239.0437 195.0534 ; 183.0523 ; 155.0599	Putative dihydroxy-phenazine-1-carboxylic acid	**			
19	4.78	224.0820	ND	247; 366	C ₁₃ H ₈ N ₃ O	a: 207.0546 ; 179.0594	Phenazine-1-carboxamide				**
20	5.70	225.0662	ND	248; 368; 415	C ₁₃ H ₈ N ₂ O ₂	a: 207.0544 ; 179.0576	Phenazine-1-carboxylic acid	**			ns
21	5.82	241.0608	ND	258; 295; 368; 430	C ₁₃ H ₈ N ₂ O ₃	a: 223.0488 ; 179.0584	Hydroxyphenazine-1-carboxylic acid	**			
Pyrrrolnitrin derivatives											
22	5.32	288.9788	286.9603	193; 206; 215; 303	C ₁₀ H ₆ Cl ₂ N ₂ O ₄	b: 229.0122 ; 209.013 ; 151.9906 ; 116.0123	Pyrrrolnitrin derivative	**			**

23	6.85	227.0148	224.9968	240; 265; 301; 400	C ₁₀ H ₈ Cl ₂ N ₂	b: 203.2076 ; 191.0145 ; 142.9913; 114.9959	Putative aminopyrrolnitrin	**	ns
24	7.15	ND	254.9686	193; 211; 246	C ₁₀ H ₆ Cl ₂ N ₂ O ₂	b: 189.9922 ; 151.0062 ; 139.0276 ; 115.0291	Pyrrrolnitrin	ns	ns
Lipophilic nitrogen compounds									
25	6.42	186.2223	ND	ND	C ₁₂ H ₂₇ N	ND	NI	ns	ns
26	6.63	212.2386	ND	ND	C ₁₄ H ₂₉ N	ND	NI	*	**
27	6.75	280.2639	ND	ND	C ₁₈ H ₃₃ NO	a: 262.253	NI	**	
28	6.90	238.2531	ND	ND	C ₁₆ H ₃₁ N	c: 126.0 ; 96.0 ; 83.0 ; 69.0 ; 55.0 ; 44.0	3,4-dihydro-5-methyl-4-alkenyl(C11:0)-2H-pyrrole	**	
29	6.97	214.2544	ND	ND	C ₁₄ H ₃₁ N	ND	NI	ns	*
30	7.05	264.2688	ND	ND	C ₁₈ H ₃₃ N	c: 178.1 ; 96.0 ; 83.0 ; 67.1 ; 55.0 ; 44.0	3,4-dihydro-5-methyl-4-alkenyl(C13:1)-2H-pyrrole	**	
31	7.08	282.2801	ND	ND	C ₁₈ H ₃₅ NO	a: 264.2694	NI	**	
32	7.47	292.3007	ND	ND	C ₂₀ H ₃₇ N	c: 206.0 ; 96.0 ; 83.1 ; 69.1 ; 55.0 ; 44.0	3,4-dihydro-5-methyl-4-alkenyl(C15:1)-2H-pyrrole	**	
Cluster n°1 in molecular networking									
33	3.81	376.1297	ND	ND	NI	340.1090; 213.0608; 185.0708	NI	**	
34	5.05	358.1197	ND	ND	NI	340.1057; 213.0663; 185.0704	NI	**	
35	6.72	514.1526	ND	ND	NI	351.0866; 211.0757	NI	**	
Cluster n°2 in molecular networking									
36	4.88	361.1303	ND	ND	NI	145.0759	NI	**	
37	5.58	385.1917	ND	ND	NI	315.0843; 145.0756	NI	**	
38	5.63	387.2076	ND	ND	NI	181.0998; 145.0749	NI	**	

ND: not detected; NI: not identified; rt: retention time; λ : maximum spectral absorbance wavelengths
a: ESI +; b: ESI -; c: EI + (with ESI +/-: electrospray ionization in positive and negative ionization mode, EI +: electron impact ionization in positive ionization mode)
† : log₂ foldchange between planktonic and biofilm colony production, for each compound (line) and each strain (column). Statistical level is indicated with ns (not significant), * (*P*-value<0.05), ** (*P*-value<0.01), based on Wilcoxon test.



Other compounds strongly influenced by bacterial lifestyle were phenazines. *P. chlororaphis* JV395B and *P. chlororaphis* JV497 did not produce the same phenazine derivatives. Indeed, both strains produced phenazine-1-carboxylic acid (PCA), but *P. chlororaphis* JV395B produced hydroxyl derivatives of PCA, like 2-hydroxy-phenazine-1-carboxylic acid (OH-PCA), putative dihydroxy-phenazine-1-carboxylic acid (di-OH-PCA) and 2-hydroxyphenazine (OH-Phz), whereas *P. chlororaphis* JV497 produced an aminated derivative, phenazine-1-carboxamide (PCN) (Fig. 4). In our analysis, their intensities were closed to background noise in planktonic cultures, while they became major compounds in biofilm colony, with different proportions according to chemical derivatives (Table 2). Indeed, *P. chlororaphis* JV395B produced 6 times more PCA, 18.3 times more OH-PCA and 229.1 times more OH-Phz in biofilm colony than in the planktonic lifestyle. In the case of JV497, it produced low amount of PCA; most of this compound was transformed into PCN that is 56 times more produced in biofilm

colony. Phenazines have antimicrobial activity and play a complex role in the ecology and lifestyle of organisms, including in biofilms (Price-Welan *et al.*, 2006; Selin *et al.*, 2010). Their biological activity depends on the chemical structure of phenazine derivatives. Maddula and collaborators in 2008 showed that more efficient conversion of PCA into OH-PCA resulted in better initial biofilm attachment and significant changes in mature biofilm architecture, OH-PCA being more produced in biofilms than PCA. Both phenazines and AHLs corresponded to main discriminant compounds separating *P. chlororaphis* biofilm and planktonic cells on the principal component analysis (Fig. 2). Phenazine production is under the control of quorum sensing regulation systems *phzI/phzR* and *aurI/aurR* (Maddula *et al.*, 2006), especially by 3-OH-C₆-HSL (Morohoshi *et al.*, 2017). It can therefore be assumed that enhanced quorum sensing signalling in biofilm colony was related to increased phenazine production in biofilm.

Finally, 8 lipophilic nitrogen metabolites belonging to the same MN cluster more produced in biofilm were detected in *Pseudomonas* cultures (i.e. for instance 25.6, 13.7 and 44.6-fold for compounds 28, 30 and 32) (Fig. 4). Three of these compounds were characterized as 3,4-dihydro-5-methyl-4-alkyl(C11:0)-pyrrole, 3,4-dihydro-5-methyl-4-alkenyl(C13:1)-2H-pyrrole and 3,4-dihydro-5-methyl-4-alkenyl(C15:1)-2H-pyrrole (compounds n° 28, 30 and 32 in Table 2; Fig. 4; Fig. S2). There is no information on the biological activity of these derivatives of 1-pyrroline, but we know they have been previously isolated in *P. putida* DSM 3601 cultures (Hildebrand and Budzikiewicz, 1986). Compounds 25, 26 and 29 were produced by the 4 *Pseudomonas* strains whereas compounds 27, 28 and 30 to 32 were only produced by F113. Six other metabolites produced by *P. chlororaphis* JV395B corresponding to MN clusters n°1 and n°2 (Fig. 4) were also strongly overproduced in biofilm but we were unable to chemically identify them.

Concluding remarks

Plant-associated bacteria can colonize roots under a wide range of conditions by forming biofilms. Biofilm cells are clearly physiologically distinct from free-living bacterial cells and express emergent properties that are not predictable from the study of free-living bacterial cells (Stoodley *et al.*, 2002). In the present study, we combined genome mining and comparative metabolomics analyses to characterize the metabolomes of four plant-associated *Pseudomonas* strains in biofilm and planktonic conditions. We have highlighted that a higher

diversity of *Pseudomonas* secondary metabolites were produced in biofilm colony than in planktonic lifestyle. The majority of metabolites were still uncharacterized but some of the major compounds implicated in bacterial biotic interactions like AHLs or phenazines were strongly enhanced in biofilms. It is reasonable to think that the enhanced biosynthesis of secondary metabolites in biofilm will influence the biotic interactions of fluorescent *Pseudomonas* with their host plant and with other micro-organisms within the rhizosphere (Fig. 5). This work provides new relevant avenues regarding inoculum development in that biofilms should be considered as a critical way to enhance the biocontrol and biostimulant activity of bacteria, since biofilms lead to the enhanced biosynthesis of a broad diversity of secondary metabolites and of crucial elements for plant growth promotion.

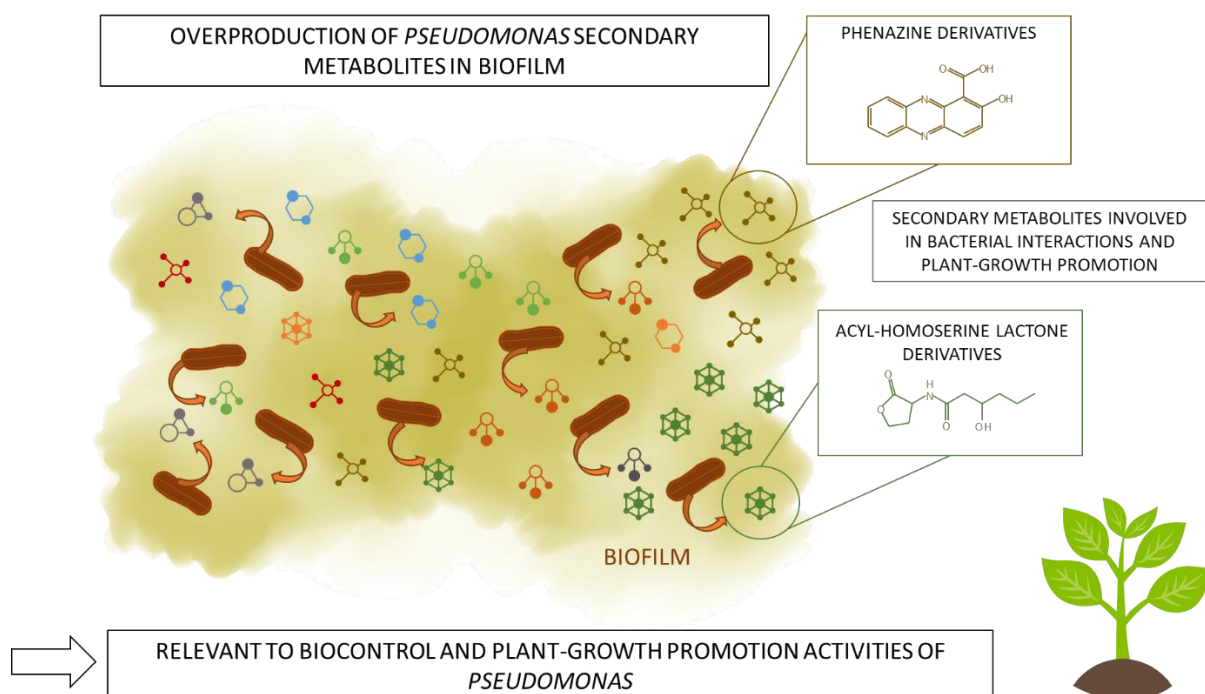


Figure 5. *Pseudomonas* strains produce a higher diversity of secondary metabolites in biofilm-colonies than in planktonic lifestyle. In particular, the biosynthesis of key compounds implicated in bacterial biotic interactions like AHLs or phenazines are strongly enhanced in biofilms. Biofilms are thus key ways to enhance the biocontrol and biostimulant activities of bioinoculant for agriculture purposes.

Experimental procedures

Biological material and culture growth conditions

This study was performed on 4 strains belonging to the fluorescent *Pseudomonas* group: *Pseudomonas kilonensis* F113 isolated in 1992 from the sugar beet rhizosphere (Shanahan *et*

al., 1992) and three *Pseudomonas* strains isolated in our lab in 2013 from bulk soil in maize planted fields, *Pseudomonas chlororaphis* JV395B and JV497 and *Pseudomonas koreensis* JV222 (Vacheron *et al.*, 2016). *Pseudomonas* strains were routinely grown in King's B (KB) agar medium (King *et al.*, 1954) and Luria Bertani (LB) broth medium (Bertani, 1951) at 28°C. Gentamycin (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA) was used at 25 µg.ml⁻¹. Minimum medium (MM) was used for both planktonic and biofilm colony conditions, which is composed of fructose (14.4 g.l⁻¹), NH₄Cl (1 g.l⁻¹), KH₂PO₄ (1.36 g.l⁻¹) /K₂HPO₄ (1.74 g.l⁻¹), MgSO₄ (0.8 g.l⁻¹) and a mix of 15 amino acids (alanine, arginine, asparagine, aspartic acid, cysteine, glutamic acid, glycine, histidine, isoleucine, leucine, phenylalanine, threonine, tryptophan, tyrosine, valine at 0.01 mg.ml⁻¹ each). Fructose was used as carbon source because it is one of the dominant sugars in wheat root exudates (Jalali and Suryanarayana, 1971; Vančura and Hanzlíková, 1972; Derrien *et al.*, 2004), it is known to stimulate the biosynthesis of antimicrobial compounds in *Pseudomonas* (Shanahan *et al.*, 1992; Duffy and Défago, 1999), and it allowed comparable growth of the four *Pseudomonas* strains (data not shown). Broth and agar MM medium only differ by the addition of agar 12 g.l⁻¹ (European biological agar, Pronadisa, Conda Ltd., Madrid, Spain).

Analysis of bacterial root colonization by confocal laser scanning microscopy and fluorescence quantification

The production of biofilms by *Pseudomonas* strains on plant roots was performed on wheat cultivar Bordeaux 13 7973 and Adular 797 (INRA Clermont-Ferrand GEDEC, France). All strains were tagged with mCherry, to monitor bacterial cell colonization by fluorescence microscopy. The plasmid pOT1eM from Meyer *et al.* (2018), obtained by cloning the *mCherry* gene under P_{tac} promoter control (constitutive expression) was introduced by electroporation, and tagged strains were selected on KB Gm25 at 28°C. Root colonization patterns of *Pseudomonas* strains were performed on wheat under gnotobiotic systems. Wheat seeds were surface sterilized as described by Pothier *et al.* (2007). Disinfected seeds were germinated on sterile plant agar medium (8 g.l⁻¹) (Sigma Chemical Co.) for 3 days in the dark at 28 °C. Bacterial inoculants were grown overnight in liquid LB Gm25, at 28 °C, and at 180 g. The cells were collected by centrifugation at 5000 g during 10 min, gently washed, suspended in MgSO₄ 10 mM, and the suspensions adjusted to the final required concentrations. Inoculation of each strain on wheat cultivar was done by adding 50 µl of a 10⁷ cells/mL suspension on germinated seeds (i.e. 5. 10⁵

cells/plant). The same volume of MgSO₄ solution was added for uninoculated controls. Square plates (120 X 120 X 17 mm; Greiner Bio-One Ltd., Stonehouse, UK) containing water agar plant (8 g.l⁻¹) and four seedlings were used. The plates were placed for 7 days in a growth chamber at 21 °C with 16 h of light (150 IE/m²/s) and 8 h of dark, and hygrometry rate of 60%. For confocal laser scanning microscopy (CLSM), samples 1-2 cm in length were cut from apical root and hair root zones and mounted in Aqua-Poly/Mount (Polysciences, Eppelheim, Germany). A microscope Confocal Zeiss LSM 800 (Carl Zeiss, Le Pecq, France) equipped with argon–krypton and He-Ne lasers was used for analysis of red fluorescence emitted by bacteria (excitation at 587 nm and detection at 661 nm). Image treatment was performed using LSM software release 3.5 (Carl Zeiss). Five root systems were analysed per treatment and 3 images per root system were taken. One representative view for each strain was presented in Figure 1A. In addition, root colonization by the *Pseudomonas* strains was estimated by quantifying the mCherry fluorescence recovered from roots as previously reported (Valente *et al.*, 2020). Briefly, the roots were ground for 1 min with a FastPrep-24 Classic Instrument (MPbiomedicals, Santa Ana, CA). The biggest plant debris were pelleted by centrifugation and 200 µL of each supernatant were transferred in black 96-well plates. The mCherry fluorescence intensity of supernatants was measured with an Infinite M200 PRO microplate reader (Tecan, Mannedorf, Switzerland), using an excitation wavelength of 587 nm, and an emission wavelength of 661 nm. Non-inoculated plantlets were used as controls (Fig. 1B).

Genome analysis of *Pseudomonas* secondary metabolites

Genomic DNA extraction was done from an overnight culture of strains JV395B, JV497 and JV222, using a Nucleospin tissue kit (Macherey Nagel—740952.50, Hoerd, France). Genomic DNA was sequenced at Mr. DNA (Shallowater, TX, USA). Genome sequencing was performed using MiSeq Illumina technology generating a 2 × 300 bp paired-end library. The NGen V14 (DNASTar, Inc) was used to trim sequences (default settings) and for *de novo* assembling (average size of *P. fluorescens* genomes as assembly parameters). Gene cluster coding for secondary metabolites were identified using the MicroScope web platform by BLAST comparison (Vallenet *et al.*, 2017) with characterized secondary metabolite gene clusters and reference strains available in literature and using antiSMASH (Medema *et al.*, 2011; Blin *et al.*, 2017). Only clusters with reliable prediction were reported. Bacteriocins were not reported. Draft genomes of *Pseudomonas* strains have been deposited at the NCBI under BioProject ID

PRJNA565121, sample SAMN12734735 for *Pseudomonas chlororaphis* JV395B, under BioProject ID PRJNA565122, sample SAMN12734736 for *Pseudomonas chlororaphis* JV497 and under BioProject PRJNA564967, sample SAMN12727389 for *Pseudomonas koreensis* JV222. Genome sequences of the de novo assembly have also been deposited at DDBJ/EMBL/GenBank under the accession numbers VWPB00000000 for strain JV395B, VWPC00000000 for strain JV497, and VWPA00000000 for strain J222. The accession number of *P. kilonensis* F113 genome is CP003150.1.

Planktonic and biofilm colony culture conditions and metabolite extraction

Bacterial cultures were made either in liquid fructose minimal medium (MM) (i.e. planktonic culture) or on MM agar (i.e. biofilm colony culture). Bacterial inoculants were obtained after overnight growth in LB medium and washed twice with MM broth. Experimentation was carried out in 24-well plate (Cellstar®, Greiner bio-one, France). Distinct wells were used for biofilm cultures on MM agar and for planktonic cultures in MM broth. One millilitre of MM broth and of MM agar per well were inoculated with each of the four strains with an initial population of 5.10^6 CFU.ml⁻¹. Then, plates were sealed with (AeraSeal®-Dominique Dutscher, France) and incubated at 28 °C, during 6 days. Biofilm-colonies were formed at the air-agar interface (Cabeen *et al.*, 2016). Un-inoculated agar and broth media were also integrated as control conditions. All conditions were performed in 6 replicates leading to a total of 60 samples. Metabolite extractions were conducted on the whole bacterial cultures, i.e. bacterial cells and MM broth for planktonic cultures and bacterial biofilm-colonies and MM agar for biofilm culture. Indeed, whole planktonic and biofilm cultures were transferred into Ependorf© tubes and extracted with 750 µL of ethyl acetate. Liquid/liquid partition was implemented for broth medium, and solid/liquid extraction was done on divided pieces of agar (5 mm X 5 mm X 3 mm). Solid/liquid extraction was made by agitation at 150 g during 10 min and sonication 10 min, centrifugation and recovery of the supernatant. Liquid/liquid partition was performed by 10 min of agitation and recovery of the upper organic phase after a resting period of 5 min. The extraction protocol was repeated ~~one more~~, giving a total extract volume of 1500 µL by sample. Then, the organic phase (ethyl acetate) was dried using a SpeedVac (Centrivap Coldtrap Concentrator LABCONCO). Dried extracts were suspended in 50 µl of methanol and centrifuged for 5 min at 12 000 g for both liquid and solid culture samples. The efficiency of the extraction method on planktonic and biofilm-colony sample types was compared thanks

to the quantification of an internal standard, tryptophan, in un-inoculated MM broth and MM agar. No difference was observed between the tryptophan concentrations recovered from broth and agar (P -value = 0.21, Wilcoxon test, Fig. S1). Forty-five microliters were then transferred in vials for Ultra High Pressure Liquid Chromatography coupled with mass spectrometry (UHPLC-MS) analysis. A quality-control (QC) sample was prepared by mixing 2 μ L of each sample previously described (60 samples) in order to control analytical repeatability during UHPLC-MS analysis.

Liquid chromatography coupled with high resolution mass spectrometry (LC-HRMS) analysis

Secondary metabolites were analysed using Agilent Technologies® Accurate-Mass Q-TOF LCMS 6530, with LC 1290 Infinity system. The separation was carried out at 40°C using a 120 EC-C18 column (3.0 X 100mm X 2.7 μ m; Agilent Poroshell). Each sample (3 μ l) was injected at the head of the column, and the column was eluted at 0.7 ml/min with a solvent gradient using solvent A (water with formic acid 0.4% (v/v)) and solvent B (acetonitrile). Proportion of solvent B increases, step by step, from 10% to 36% during 4.5 min; 36% to 100% during 4 min, followed by 2 min isocratic phase with 100% solvent B; back from 100% to 10% in 0.5 min and equilibration at 10% solvent B during 3 min until the end of the run at 14 min. Mass analyses were made in positive and negative mode, with the nebulization gas (Nitrogen) at a flow of 10 L.min⁻¹ and 40 psg pressure. The capillary tension was 3000 V and gave ionisation energy of 100 eV. Analyses included QC and blank samples every 10 sample runs, giving a total of 8 blanks and 8 QCs. Moreover, in order to facilitate the identification of specific compounds and allow molecular network output, some samples were analysed with tandem mass spectrometry (MS/MS). MS/MS analyses were performed by collision induced dissociation (CID) with a collision energy of 20 eV. Chromatograms were explored with Mass Hunter Qualitative Analysis B.07.00 software (Agilent Technologies).

Gas chromatography coupled with mass spectrometry (GC-MS) analysis

Complementary GC-MS analyses were conducted on each sample to allow metabolite identification, using the method described by Rosier *et al.* (2016). Aliquots of 1 μ L were injected in split-less mode using an Agilent 7000A EI triple Quad coupled with the 7890A GC system on

Agilent 100915 – 433 column (HP5-MS, 0.25 mm X 30m X 0.25 μ M). Chromatograms were explored with Mass Hunter Qualitative Analysis B.07.00 software.

Data processing, statistical analysis, metabolite identification and molecular networking

Our metabolomic analysis workflow was focused on small molecules (<1000 Da). LCMS raw files were converted to mzXML format using MS convert "ProteoWizard 2.1" with filtering m/z outside the range of [50 - 450] seconds (Kessner *et al.*, 2008). The data were then processed using both R software and the collaborative Galaxy platform "Workflow4metabolomics" version 3.3 (Giacomoni *et al.*, 2014). The overall workflow of data processing is as follows: (1) peak extraction (xcms R package 3.6.1) (Smith *et al.*, 2006), (2) peak alignment (xcms R package 3.6.1), (3) elimination of ions also found in blank samples, (4) elimination of ions having a coefficient of variation (CV) of signal intensity higher than 25% in QC pool samples, (5) elimination of the isotopic ions or adducts that represent the same molecule (CAMERA R-package and manual control validation) (Kuhl *et al.*, 2012), (6) transformation of ions intensity into log₁₀, (7) substitution of every log₁₀ intensity value under 3.5 by a threshold of 3.5 in order to avoid interference due to missing value (feature not detected in a single class but detected in other classes) (Di Guida *et al.*, 2016). Then, after normalization and filtration steps, table matrix containing the intensity areas for each feature defined by the couple retention time and m/z was used for statistical analysis. All XCMS parameters were described in Table S1. Statistical analyses were realized using R logiciel 3.5.1©2018 software version. Principal component analyses were made with R package Ade4 (Thioulouse *et al.*, 1997; Chessel *et al.*, 2004). Non-parametric univariate statistical analyses were conducted using Wilcoxon rank sum statistical test (P -value = 0.05) on ion intensities for each strain in planktonic or biofilm-colony lifestyle. Heatmap representation was done with the PermutMatrix software (Caraux *et al.*, 2005). Identification of monoacetylphloroglucinol (MAPG), 2,4-diacetylphloroglucinol (DAPG), pyrrolnitrin, indole-3-acetic-acid (IAA), phenazine-1-carboxylic acid (PCA), 3-OH-C₆-HSL and dimethyl 2,6-pyridinedicarboxylate were confirmed by comparison of the retention time and accurate mass of compounds in bacterial culture extracts with those of pure chemical standards (Table S1). Other phenazine, HSL or dimethyl 2,6-pyridinedicarboxylate derivatives were characterized by implementing a molecular networking approach and by comparing their UV spectra, accurate mass and MS/MS fragmentations to those of standards of PCA, 3-OH-C₆-HSL and dimethyl 2,6-pyridinedicarboxylate. Finally, 3,4-dihydro-5-methyl-4-alkyl(C11:0)-pyrrole,

3,4-dihydro-5-methyl-4-alkenyl(C13:1)-2H-pyrrole and 3,4-dihydro-5-methyl-4-alkenyl(C15:1)-2H-pyrrole were characterized by comparing mass spectrometry (MS) accurate mass and MS/MS fragmentation to spectral data from the publication of Hildebrand and Budzikiewicz (1986). Finally, in view to characterize *Pseudomonas* secondary metabolites produced in biofilm, a molecular networking (MN) approach was developed, thanks to Metgem software with cosine score = 0.6 (Olivon et al. 2018). MN was conducted on MSMS data from *Pseudomonas* biofilm extracts according to the protocol described by Olivon and collaborator in 2019. MSMS data converted to mzXML format were processed using MZmine 2 v2.53 53. All parameters were presented in Table S2.

Acknowledgments

Laura Rieusset was supported by a Ph.D. fellowship from the French Ministère de l'Education Nationale, de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche. We acknowledge the LABGeM and the National Infrastructure "France Genomique" for support within the MicroScope annotation platform. We also thank the FR BioEnviS Research Federation platform "Centre Technologique des Microstructures" and the Microbial Ecology laboratory platforms, iBio (in particular D. Abrouk) and CESN ("Centre d'Etude des Substances Naturelles"). We thank J. Le Gouis and the CRB 'Céréales à Paille' for providing seeds of the 2 wheat cultivars. We also thank our colleagues F. Wisniewski-Dyé and J. Almario for their useful comments and English corrections. The authors declare that they have no conflict of interest.

References

- Al-Ali, A., Deravel, J., Krier, F., Béchet, M., Ongena, M., & Jacques, P. (2017). Biofilm formation is determinant in tomato rhizosphere colonization by *Bacillus velezensis* FZB42. *Environ Sci Pollut Res* **25**: 29910–29920.
- Almario, J., Bruto, M., Vacheron, J., Prigent-Combaret, C., Moëgne-Loccoz, Y. and Muller, D., (2017) Distribution of 2,4-diacetylphloroglucinol genes reveals unexpected polyphyleticism. *Front Microbiol* **8**: 1218.
- Bertani, G., (1951) Studies on lysogenesis I. *J. Bacteriol* **62**: 293–300.
- Besset-Manzoni, Y., Rieusset, L., Joly, P., Comte, G., and Prigent-Combaret, C. (2018) Exploiting rhizosphere microbial cooperation for developing sustainable agriculture strategies. *Environ Sci Pollut Res* **25**:1–18.
- Blin, K., Wolf, T., and Chevrette, M.G., et al. (2017) antiSMASH 4.0-improvements in chemistry prediction and gene cluster boundary identification. *Nucleic Acids Res* **45**(W1):W36–W41.
- Brazelton, J.N., Pfeufer, E.E., Sweat, T.A., Gardener, B.B.M., and Coenen, C. (2008). 2,4-diacetylphloroglucinol alters plant root development. *Mol Plant-Microbe Interact* **21**: 1349–1358.
- Brink, S.C. (2016) Unlocking the secrets of the rhizosphere. *Trends Plant Sci.* **21**: 169-170.
- Budzikiewicz, H., Lange, E. and Ockels, W. (1981) The mass spectral fragmentation behavior of pyridine carboxylic and thiocarboxylic acid esters. *Phosphorus and Sulfur and the Related Elements* **11**: 33–45.
- Budzikiewicz, H. (2003) Heteroaromatic monothiocarboxylic acids from *Pseudomonas* spp. *Biodegradation* **14**: 65–72.
- Cabeen, M.T., Leiman, S.A., and Losick, R. (2016) Colony-morphology screening uncovers a role for the *Pseudomonas aeruginosa* nitrogen-related phosphotransferase system in biofilm formation. *Mol Microbiol* **99**:557–570.
- Caraux, G., and Pinloche, S. (2005). PermutMatrix: A graphical environment to arrange gene expression profiles in optimal linear order. *Bioinformatics* **21**: 1280–1281.
- Charlton, T.S., de Nys, R., Kumar, N., Hentzer, M., Givskov, M., and Kjelleberg, S. (2000). A novel and sensitive method for the quantification of N-3-oxoacyl homoserine lactones using gas chromatography- mass spectrometry: application to a model bacterial biofilm. *Environ Microbiol* **2**: 530–541.
- Chessel, D., Dufour, A.B., and Thioulouse, J. (2004). The ade4 package - I: One-table methods. *R News* **4**: 5–10.
- Combes-Meynet, E., Pothier, J.F., Moëgne-Loccoz, Y., and Prigent-Combaret, C. (2011) The *Pseudomonas* secondary metabolite 2,4-diacetylphloroglucinol is a signal inducing rhizoplane expression of *Azospirillum* genes involved in plant-growth promotion. *Mol Plant-Microbe Interact* **24**: 271–284.

- Cortese, M.S., Paszczynski, A., Lewis, T.A., Sebat, J.L., Borek, V., and Crawford, R.L. (2002). Metal chelating properties of pyridine-2,6-bis(thiocarboxylic acid) produced by *Pseudomonas spp.* and the biological activities of the formed complexes. *BioMetals* **15** : 103–120.
- Couillerot, O., Prigent-Combaret, C., Caballero-Mellado, J., and Moënne-Loccoz, Y. (2009). *Pseudomonas fluorescens* and closely-related fluorescent pseudomonads as biocontrol agents of soil-borne phytopathogens. *Lett Appl Microbiol* **48**: 505–512.
- Cullinane, M., Baysse, C., Morrissey, J. P., and O’Gara, F. (2005). Identification of two lysophosphatidic acid acyltransferase genes with overlapping function in *Pseudomonas fluorescens*. *Microbiol* **151**: 3071–3080.
- Danhorn, T., and Fuqua, C. (2007) Biofilm formation by plant-associated bacteria. *Annu Rev Microbiol* **61**: 401-422.
- Derrien, D., Marol, C., and Balesdent, J. (2004).The dynamics of neutral sugars in the rhizosphere of wheat. An approach by ¹³C pulse-labelling and GC/C/IRMS. *Plant Soil* **267**: 243–253.
- Dettmer, K., Aronov, P.A., and Hammock, B.D. (2007) Mass spectrometry-based metabolomics. *Mass Spectrom Rev* **26**: 51–78.
- De Werra, P., Baehler, E., Huser, A., Keel, C., and Maurhofer, M. (2008) Detection of plant-modulated alterations in antifungal gene expression in *Pseudomonas fluorescens* CHA0 on roots by flow cytometry. *Appl Environ Microbiol* **74**:1339-1349.
- Di Guida, R., Engel, J., Allwood, J.W., Weber, R.J.M., Jones, M.R., Sommer, U., and Dunn, W.B. (2016) Non-targeted UHPLC-MS metabolomic data processing methods: a comparative investigation of normalisation, missing value imputation, transformation and scaling. *Metabolomics* **12**: 1–14.
- Duffy, B.K., and Défago, G. (1999) Environmental factors modulating antibiotic and siderophore biosynthesis by *Pseudomonas fluorescens* biocontrol strains. *Appl Environ Microbiol* **65**: 2429–2438.
- Duncan, K.R., Crusemann, M., Lechner, A., Sarkar, A., Li, J., Ziemert, N., Wang, M., Bandeira, N., Moore, B.S., Dorrestein, P.C., et al. (2015) Molecular networking and pattern-based genome mining improves discovery of biosynthetic gene clusters and their products from *Salinispora* species. *Chem Biol* **22**: 460–471.
- Favre, L., Ortalo-Magné, A., Greff, S., Pérez, T., Thomas, O.P., Martin, J.C., and Culioli, G. (2017) Discrimination of four marine biofilm-forming bacteria by LC-MS metabolomics and influence of culture parameters. *J Proteome Res* **16**: 1962–1975.
- Favre, L., Ortalo-Magné, A., Pichereaux, C., Gargaros, A., Burlet-Schiltz, O., Cotelle, V., and Culioli, G. (2018) Metabolome and proteome changes between biofilm and planktonic phenotypes of the marine bacterium *Pseudoalteromonas lipolytica* TC8. *Biofouling* **34**: 132–148.
- Flemming, H.-C., Wingender, J., Szewzyk, U., Steinberg, P., Rice, S. A., and Kjelleberg, S. (2016) Biofilms: an emergent form of bacterial life. *Nat Rev Microbiol.* **14**: 563–575.
- Giacomini, F., Le Corguillé, G., Monsoor, M., Landi, M., Pericard, P., Pétéra, M., Caron, C. (2015) Workflow4Metabolomics: A collaborative research infrastructure for computational metabolomics. *Bioinformatics* **31**: 1493–1495.

- Gjersing, E.L., Herberg, J.L., Horn, J., Schaldach, C.M., and Maxwell, R.S. (2007) NMR metabolomics of planktonic and biofilm modes of growth in *Pseudomonas aeruginosa*. *Anal Chem* **79**: 8037–8045.
- Gross, H., and Loper, J.E. (2009) Genomics of secondary metabolite production by *Pseudomonas spp.* *Nat Prod Rep* **26**: 1408–1446.
- Haichar, Z., Santaella, C., and Heulin, T. (2014) Soil biology and biochemistry root exudates mediated interactions belowground. *Soil Biol Biochem* **77**: 69–80.
- Hildebrand, U. and Budzikiewicz, H. (1986) (+)-3,4-Dihydro-5-methyl-4-n-alkyl- und alkenyl-2H-pyrrole aus *Pseudomonas putida*. *Z. Naturforsch* **41**: 1161-1169.
- Hu, W., Gao, Q., Hamada, M. S., Dawood, D.H., Zheng, J., Chen, Y., et al. (2014) Potential of *Pseudomonas chlororaphis subsp. aurantiaca* Strain Pcho10 as a biocontrol agent against *fusarium graminearum*. *Phytopathol* **104**: 1289–1297.
- Hunter, S.S., Yano, H., Loftie-Eaton, W., Hughes, J., De Gelder, L., Stragier, P., and Top, E.M. (2014) Draft genome sequence of *Pseudomonas moraviensis* R28-S. *Genome Announc.* **2**: 153–154.
- Jalali, B.L., and Suryanarayana, D. (1971) Shift in the carbohydrate spectrum of root exudates of wheat in relation to its root-rot disease. *Plant Soil* **34**:261–267.
- Jousset, A., and Bonkowski, M. (2010) The model predator *Acanthamoeba castellanii* induces the production of 2,4-DAPG by the biocontrol strain *Pseudomonas fluorescens* Q2-87. *Soil Biol Biochem* **42**: 1647–16
- Keller, L., and Surette, M.G. (2006) Communication in bacteria: An ecological and evolutionary perspective. *Nat Rev Microbiol* **4**: 249–258.
- Kessner, D., Chambers, M., Burke, R., Agus, D., and Mallick, P. (2008) ProteoWizard: Open source software for rapid proteomics tools development. *Bioinformatics* **24**: 2534–2536.
- 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.
- Kuhl, C., Tautenhahn, R., Böttcher, C., Larson, T.R., and Neumann, S. (2012) CAMERA: An integrated strategy for compound spectra extraction and annotation of liquid chromatography/mass spectrometry data sets. *Anal Chem* **84**: 283–289.
- Laue, B.E., Y. Jiang, S.R. Chhabra, S. Jacob, G.S. Stewart, A. Hardman, J.A. Downie, F. O’Gara, and P. Williams (2000) The biocontrol strain *Pseudomonas fluorescens* F113 produces the *Rhizobium* small bacteriocin, N-(3-hydroxy-7-cis-tetradecenoyl)homoserine lactone, via HdtS, a putative novel N-acylhomoserine lactone synthase. *Microbiol* **146**: 2469–2480
- Lee, J. H., and Lee, J. (2010) Indole as an intercellular signal in microbial communities. *FEMS Microbiol Rev*, **34**: 426–444.
- Loper, J.E., Hassan, K.A., Mavrodi DV et al. (2012) Comparative genomics of plant-associated *Pseudomonas spp.*: insights into diversity and inheritance of traits involved in multitrophic interactions. *PLoS Genet* **8**: e1002784.

- Maddula, V.S.R.K., Zhang, Z., Pierson, E.A., and Pierson, L.S. (2006) Quorum sensing and phenazines are involved in biofilm formation by *Pseudomonas chlororaphis (aureofaciens)* strain 30-84. *Microbiol Ecol* **52**: 289–301.
- Maddula, V.S.R.K., Pierson, E.A., and Pierson, L.S. (2008) Altering the ratio of phenazines in *Pseudomonas chlororaphis (aureofaciens)* strain 30-84: Effects on biofilm formation and pathogen inhibition. *J Bacteriol* **190**: 2759–2766.
- Mavrodi, D.V., Parejko, J.A., Mavrodi, O.V., Kwak, Y.S., Weller, D.M., Blankenfeldt, W., and Thomashow, L.S. (2013) Recent insights into the diversity, frequency and ecological roles of phenazines in fluorescent *Pseudomonas spp.* *Environ Microbiol* **15**: 675–686.
- Mazzola, M., Cook, R.J., Thomashow, L.S., Weller, D.M., and Pierson, L.S. (1992) Contribution of phenazine antibiotic biosynthesis to the ecological competence of fluorescent pseudomonads in soil habitats. *Appl Environ Microbiol* **58**: 2616–2624.
- Medema, M.H., Blin, K., Cimermancic, P., De Jager, V., Zakrzewski, P., Fischbach, M.A., Breitling, R. (2011) AntiSMASH: Rapid identification, annotation and analysis of secondary metabolite biosynthesis gene clusters in bacterial and fungal genome sequences. *Nucleic Acids Res* **39**: 339–346.
- Meyer, T., Vigouroux, A., Aumont-Nicaise, M., Comte, G., Vial, L., Lavire, C., and Moréra, S. (2018) The plant defense signal galactinol is specifically used as a nutrient by the bacterial pathogen *Agrobacterium fabrum*. *J Biol Chem* **293**: 7930–7941.
- Mikkelsen, H., Duck, Z., Lilley, K.S., Welch, M. (2007) Interrelationships between colonies, biofilms, and planktonic cells of *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol* **189**: 2411–2416
- Morohoshi, T., Wang, W.Z., Suto, T., Saito, Y., Ito, S., Someya, N., and Ikeda, T. (2013) Phenazine antibiotic production and antifungal activity are regulated by multiple quorum-sensing systems in *Pseudomonas chlororaphis* subsp. *aurantiaca* StFRB508. *J Biosci Bioeng* **116**: 580–584.
- Morohoshi, T., Yamaguchi, T., Xie, X., Wang, W., Takeuchi, K., and Someya, N. (2017) Complete Genome Sequence of *Pseudomonas chlororaphis* subsp. *Aurantiaca* reveals a triplicate quorum-sensing mechanism for regulation of phenazine production. *Microbes Environ* **32**: 47–53.
- Noirot-Gros, M.F., Shinde, S., Larsen, P.E., Zerbs, S., Korajczyk, P.J., Kemner, K.M., and Noirot, P.H. (2018) Dynamics of aspen roots colonization by Pseudomonads reveals strain-specific and mycorrhizal-specific patterns of biofilm formation. *Front Microbiol* **9**: 1–16.
- Oni, F.E., Kieu Phuong, N., and Höfte, M. (2015) Recent advances in *Pseudomonas* biocontrol. In *Bacterial-plant interactions: Advance research and future trends*. Murillo, J., Vinatzer, B.A., Jackson, R.W., and Arnold, D.L. (eds). Poole, UK: Caister Academic Press, pp. 167-198.
- Olivon, F., Elie, N., Grelier, G., Roussi, F., Litaudon, M., Touboul, D. (2018) MetGem Software for the generation of molecular networks based on the t-SNE algorithm. *Anal. Chem.* **90**: 13900–13908.
- Olivon, F., Remy, S., Grelier, G., Apel, C., Eydoux, C., Guillemot, J. C., Litaudon, M. (2019) Antiviral compounds from *codiaeum peltatum* targeted by a multi-informative molecular networks approach. *J Nat Prod.* **82**: 330–340.

- Pandin, C., Le Coq, D., Canette, A., Aymerich, S., and Briandet, R. (2017) Should the biofilm mode of life be taken into consideration for microbial biocontrol agents? *Microb Biotechnol* **10**: 719–734.
- Plyuta, V.A., Lipasova, V.A., Kuznetsov, A.E., and Khmel I.A. (2013) Effect of salicylic, indole-3-acetic, gibberellic, and abscisic acids on biofilm formation by *Agrobacterium tumefaciens* C58 and *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. *Appl Biochem Microbiol* **49**: 706–710.
- Pothier, J.F., Wisniewski-Dyé, F., Weiss-Gayet, M., Moëgne-Loccoz, Y., and Prigent-Combaret, C. (2007) Promoter-trap identification of wheat seed extract-induced genes in the plant-growth-promoting rhizobacterium *Azospirillum brasilense* Sp245. *Microbiol* **153**: 3608–3622.
- Price-Whelan, A., Dietrich, L.E.P., and Newman, D. K. (2006) Rethinking “secondary” metabolism: physiological roles for phenazine antibiotics. *Nat Chem Biol* **2**: 71–78.
- Prigent-Combaret, C., Vidal O., Dorel C., and Lejeune P. (1999) Abiotic surface sensing and biofilm-dependent regulation of gene expression in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **181**: 5993–6002.
- Prigent-Combaret, C., Zghidi-Abouzid, O., Effantin, G., Lejeune, P., Reverchon, S., and Nasser, W. (2012) The nucleoid-associated protein Fis directly modulates the synthesis of cellulose, an essential component of pellicle-biofilms in the phytopathogenic bacterium *Dickeya dadantii*. *Mol Microbiol* **86**: 172–186.
- Ramey, B.E., Koutsoudis, M., Bodman, S.B. Von, and Fuqua, C. (2004) Biofilm formation in plant-microbe associations. *Curr Opin Microbiol* **7**: 602–609.
- Redondo-Nieto, M., Barret, M., Morrissey, J., Germaine, K., Martínez-Granero, F., Barahona, E., and Rivilla, R. (2013) Genome sequence reveals that *Pseudomonas fluorescens* F113 possesses a large and diverse array of systems for rhizosphere function and host interaction. *BMC Genomics* **25**: 14– 54.
- Rozier, C., Erban, A., Hamzaoui, J., Prigent-Combaret, C. and Comte, G. (2016) Xylem Sap Metabolite Profile Changes During Phytostimulation of Maize by the Plant Growth-Promoting Rhizobacterium, *Azospirillum lipoferum* CRT1. *Metabolomics* **6**: 2153–0769.
- Selin, C., Habibian, R., Poritsanos, N., Athukorala, S.N.P., Fernando, D., and De Kievit, T.R. (2010) Phenazines are not essential for *Pseudomonas chlororaphis* PA23 biocontrol of *Sclerotinia sclerotiorum*, but do play a role in biofilm formation. *FEMS Microbiol Ecol* **71**: 73–83.
- Shanahan, P., O'sullivan, D.J., Simpson, P., Glennon, J.D., 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.
- Silby, M.W., Cerdeño-Tárraga, A.M., Vernikos, G.S., Giddens, S.R., Jackson, R.W., Preston, G.M., Zhang, X.X., Moon, C.D., Gehrig, S.M., Godfrey, S.A., Knight, C.G., Malone, J.G., Robinson, Z., Spiers, A.J., Harris, S., Challis, G.L., Yaxley, A.M., Harris, D., Seeger, K., Murphy, L., Rutter, S., Squares, R., Quail, M.A., Saunders, E., Mavromatis, K., Brettin, T.S., Bentley, S.D., Hothersall, J., Stephens, E., Thomas, C.M., Parkhill, J., Levy, S.B., Rainey, P.B., and Thomson, N.R. (2009) Genomic and genetic analyses of diversity and plant interactions of *Pseudomonas fluorescens*. *Genome Biol* **10**: R51.
- Shanahan, P., Sullivan, D.J.O., Simpson, P., and Jeremy, D. (1992) Production Isolation of 2,4-diacetylphloroglucinol from a fluorescent pseudomonad and investigation of physiological parameters influencing its production. *Appl Environ Microbiol*. **58**: 0–5.

- Schikora, A., Schenk, S.T., and Hartmann, A. (2016) Beneficial effects of bacteria-plant communication based on quorum sensing molecules of the *N*-acyl homoserine lactone group. *Plant Mol Biol* **90**: 605–612.
- Smith, C.A., Want, E. J., Maille, G.O., Abagyan, R., and Siuzdak, G. (2006) XCMS: processing mass spectrometry data for metabolite profiling using nonlinear peak alignment, matching, and identification. *Anal Chem* **78**: 779–787.
- Spaepen, S., Vanderleyden, J., and Remans, R. (2007) Indole-3-acetic acid in microbial and microorganism-plant signaling. *FEMS Microbiol Rev* **31**, 425–448
- Stipetic, L.H., Dalby, M.J., Davies, R.L., Morton, F.R., Ramage, G., and Burgess, K.E.V. (2016) A novel metabolomic approach used for the comparison of *Staphylococcus aureus* planktonic cells and biofilm samples. *Metabolomics* **12**: 1–11.
- Stoodley, P., Sauer, K., Davies, D.G., and Costerton, J.W. (2002) Biofilms as Complex Differentiated Communities. *Annu Rev Microbiol* **56**: 187–209.
- Szkop, M., and Bielawski W. (2013) A simple method for simultaneous RP-HPLC determination of indolic compounds related to bacterial biosynthesis of indole-3-acetic acid. *A Van Leeuw J Microb* **103**: 683–691
- Thioulouse, J., and Chessel, D. (1997) ADE-4: multivariate analysis and graphical display software. *Stat Comput* **7**: 75–83.
- Vacheron, J., Desbrosses, G., Bouffaud, M.-L., Touraine, B., Moëgne-Loccoz, Y., Muller, D., and Prigent-Combaret, C. (2013) Plant growth-promoting rhizobacteria and root system functioning. *Front Plant Sci* **4**: 356.
- Vacheron, J., Moëgne-Loccoz, Y., Dubost, A., Gonçalves-Martins, M., Muller, D., and Prigent-Combaret, C. (2016) Fluorescent *Pseudomonas* Strains with only few plant-beneficial properties are favored in the maize rhizosphere. *Front Plant Sci* **7**: 1–13.
- Valente, J., Gerin, F., Le Gouis, J., Moëgne-Loccoz, Y., and Prigent-Combaret, C. (2020) Ancient wheat varieties have a higher ability to interact with plant growth-promoting rhizobacteria. *Plant Cell Environ* **43**: 246–260.
- Vančura, V., and Hanzlíková A. (1972) Root exudates of plants: IV. Differences in chemical composition of seedling exudates. *Plant Soil* **36**: 271–282.
- Van Pée, K.H., and Ligon, J.M. (2000) Biosynthesis of pyrrolnitrin and other phenylpyrrole derivatives by bacteria. *Nat Prod Rep* **17**: 157–164.
- Vallenet, D., Calteau, A., Cruveiller, S., Gachet, M., Lajus, A., Josso, A., and Medigue, C. (2017) MicroScope in 2017: An expanding and evolving integrated resource for community expertise of microbial genomes. *Nucleic Acids Res* **45**: D517–D528.
- Venturi, V., and Keel, C. (2016) Signaling in the Rhizosphere. *Trends Plant Sci* **221**: 187–198.

- Waite, R.D., Papakonstantinou, A., Littler, E., and Curtis, M.A. (2005) Transcriptome analysis of *Pseudomonas aeruginosa* growth: comparison of gene expression in planktonic cultures and developing and mature biofilms. *J. Bacteriol* **187**: 6571–6576.
- Watrous, J., Roach, P., Alexandrov, T., Heath, B. S., Yang, J. Y., Kersten, R. D., Dorrestein, P. C. (2012). Mass spectral molecular networking of living microbial colonies. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **109**: E1743-52.
- Wolfender, J.-L., Rudaz, S., Hae Choi, Y., and Kyong Kim, H. (2013) Plant metabolomics: from holistic data to relevant biomarkers. *Curr Med Chem* **20**: 1056–1090.
- Yu, J.M., Wang, D., Pierson, L.S., and Pierson, E.A. (2018) Effect of producing different phenazines on bacterial fitness and biological control in *Pseudomonas chlororaphis* 30-84. *Plant Pathol J*. **34**: 44–58.
- Zhang, Z., and Pierson, L. S. 3rd. (2001) A second quorum-sensing system regulates cell surface properties but not phenazine antibiotic production in *Pseudomonas aureofaciens*. *Appl Environ Microbiol* **67**: 4305–4315.
- Zawadzka, A.M., Crawford, R.L., and Paszczynski, A.J. (2006) Pyridine-2,6- bis(thiocarboxylic acid) produced by *Pseudomonas stutzeri* KC reduces and precipitates selenium and tellurium oxyanions. *Appl Environ Microbiol* **72**: 3119 –3129

Supplementary data

Table S1. Parameter settings used for metabolomics data processing

Step	Method	Parameters	Values
Peak detection (<i>Peakpicking</i>) ^a	centWave	ppm	10
		mzdiff	0.05
		prefilter	3, 10000
		snthresh	10
		peakwidth	4, 15
		noise	12000
Peak grouping (<i>group</i>) ^a	density	bw	5
		mzwid	0.25
		minfrac	0.05
FillPeaks	chrom		

^a data processed with xcms R-package on collaborative Galaxy platform "Workflow4metabolomics" version 3.3

Table S2. Molecular networking: MZmine 2 data-preprocessing parameters

Steps	Methods	Parameters	Values
Mass detection		Noise level MS1	0
		Noise level MS2	0
chromatogram builder	ADAP	Minimum group size of scan	4
		Group intensity threshold	3000
		Minimum highest intensity	4000
		m/z tolerance	0.005 (20 ppm)
Deconvolution	ADAP Wavelets algorithm	S/N threshold	8
		Minimum feature height	4000
		Coefficient/area threshold	20
		Peak duration range	0.05 – 1 min
		T _R wavelet range	0.01 – 0.07 min
MS2 scans paired		m/z tolerance	0.02 Da
		t _R tolerance	0.3 min
Isotopologue grouping	Isotopic peak grouper algorithm	m/z tolerance	0.005 (20 ppm)
		t _R tolerance	0.2 min
Filtering	Feature list rows filter	Retention time range	1 – 14 min
		Keep only peaks with MS2 scan	
Peak alignment	Join aligner module	m/z tolerance	0.005 (20 ppm)
		Weight for m/z	2
		t _R tolerance	0.5 min
		Weight for t _R	1
Gap filled		m/z tolerance	0.005 (20 ppm)
		t _R tolerance	0.5 min

Table S3. List of 8 chemical standards used in UHPLC-DAD-qTOF analyses

N°	Name	Molecular formula	Origin	Purity
1	Monoacetylphloroglucinol	C ₈ H ₈ O ₄	Cayman Chemical	≥98%
2	2,4-diacetylphloroglucinol	C ₁₀ H ₁₀ O ₅	Toronto Research Chemicals Inc.	≥98%
3	Pyrronitrin	C ₁₀ H ₆ Cl ₂ N ₂ O ₂	SIGMA Chemical Co.	≥98%
4	Phenazine-1-carboxylic acid	C ₁₃ H ₈ N ₂ O ₂	Toronto Research Chemicals Inc.	≥98%
5	3-OH-C6-HSL	C ₁₀ H ₁₇ NO ₄	SIGMA Chemical Co.	≥98%
6	Dimethyl 2,6-pyridinedicarboxylate	C ₉ H ₉ NO ₄	SIGMA Chemical Co.	≥98%
7	Indole-acetic-acid	C ₁₀ H ₉ NO ₂	SIGMA Chemical Co.	≥98%
8	Tryptophan	C ₁₁ H ₁₂ N ₂ O ₂	SIGMA Chemical Co.	≥98%

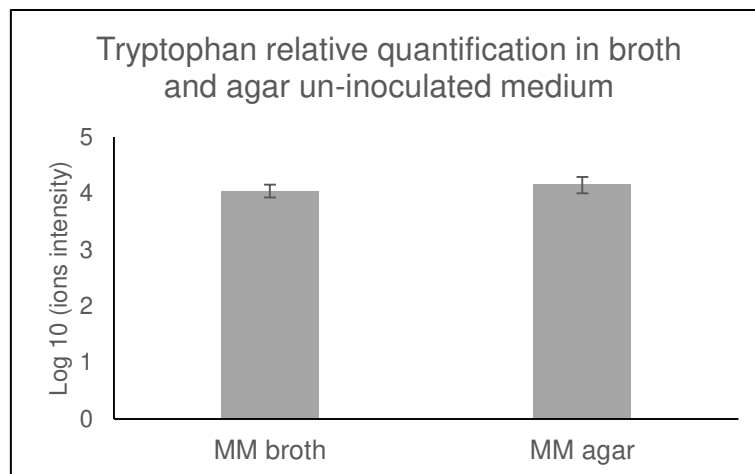


Figure S1: Tryptophan relative quantification in broth and agar un-inoculated medium. Evaluation of the efficiency on the extraction method to recover secondary metabolites embedded in agar medium was carried out thanks to tryptophan. Tryptophan was used by bacteria in inoculated medium as precursor for secondary metabolites and allowed method validation in un-inoculated medium. Tryptophan was detected in the first third of chromatogram, it presents a median polarity closed to important number of metabolites. Its relative quantification in un-inoculated MM broth and MM agar don't showed significant difference (pvalue = 0.21, Wilcoxon test) which indicated comparable efficiency of extraction methods for metabolites with median polarity. On the other hand, biofilm overproduction of important number of lipophilic metabolites (**Table 2**) demonstrate capacity of extraction methods to efficiently extract this type of metabolites from the agar medium.

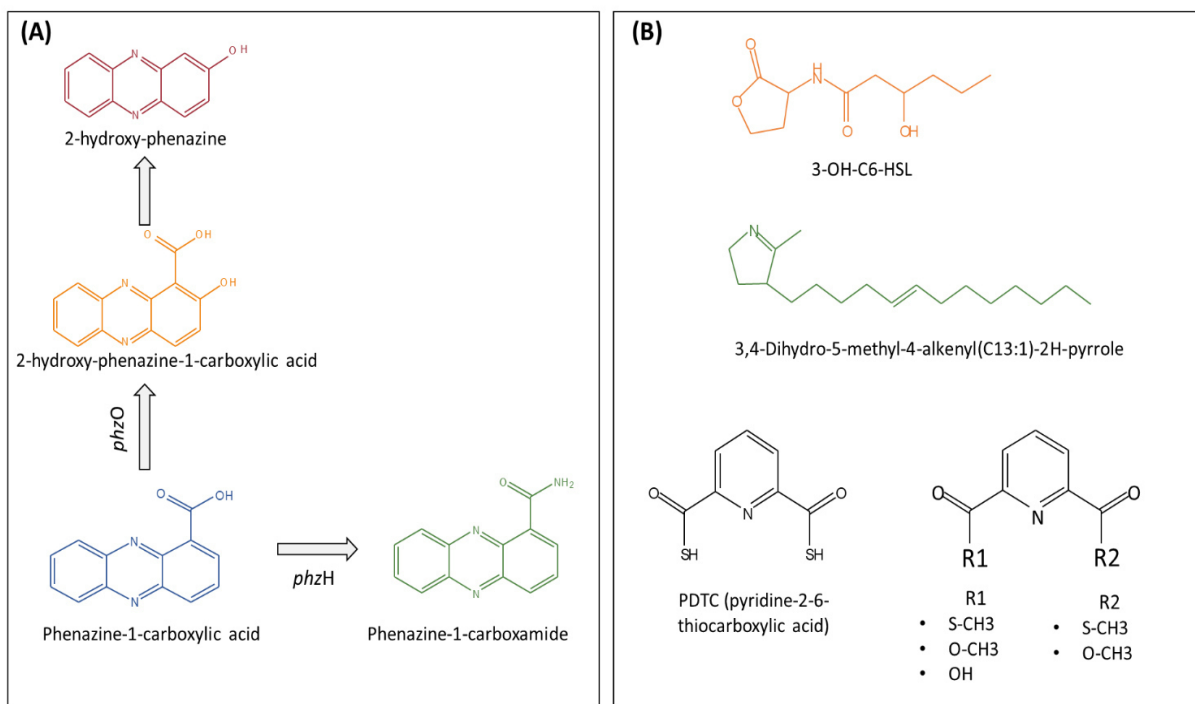


Figure S2. Chemical structures of some secondary metabolites from the studied plant-associated *Pseudomonas* strains. Transformation of phenazine-1-carboxylic acid into different derivatives thanks to genes *phzO* in JV395B and *phzH* in JV497 **(A)**; chemical structures of 3-OH-C6-HSL, 4-Dihydro-5-methyl-4-alkenyl(C13:1)-2-H-pyrrole and PDTC (pyridine-2,6-thiocarboxylic acid) derivatives **(B)**.

Chapitre 3 : Impact des
métabolites racinaires de blé sur la
physiologie des *Pseudomonas*
rhizosphériques

Préambule

L'objectif des travaux présentés dans le chapitre 2 était de caractériser le métabolisme secondaire de quatre souches de *Pseudomonas*. Le séquençage des génomes associé à la recherche des gènes impliqués dans la production de métabolites secondaire nous a permis dans un premier temps d'évaluer les capacités métaboliques des souches. Nous avons ensuite extrait et analysé les métabolites secondaires produits par chacune des souches en mode biofilm et en mode planctonique. La culture des souches selon deux modes de vie différents nous a permis de détecter plusieurs métabolites impliqués dans l'activité phytobénéfique des *Pseudomonas*, et de mettre en évidence l'importance du mode biofilm dans la production de métabolites secondaires. Plusieurs composés tels que les AHLs et les phénazines produits par les souches de *P. chlororaphis* ou encore les molécules lipophiles azotés produits par *P. kilonensis* F113 ont été décrits comme fortement surproduits en mode biofilm.

Si le biofilm est le mode de vie préférentiel des souches rhizosphériques, il faut également prendre en compte le fait que la rhizosphère soit un milieu fortement influencé par la plante hôte (Bais et al. 2006). En effet, la plante exsude au niveau de ses racines de nombreux métabolites secondaires qui peuvent avoir un impact sur son rhizomicrobiote. Plusieurs études ont montré l'impact de ces métabolites sur la sélection des taxa et sur la composition de la communauté microbienne (Brink 2016). Mais l'impact de la plante sur la physiologie et la production de métabolites secondaires des souches rhizosphériques reste encore relativement méconnu. L'objectif de ce troisième chapitre, est d'utiliser une approche métabolomique pour évaluer l'impact que peut avoir la plante hôte sur la physiologie et le métabolisme secondaire des *Pseudomonas*.

Après avoir caractérisé les métabolites secondaires racinaires, des 3 génotypes de blé, les extraits correspondants ont ensuite été mis en contact de chacune des souches de *Pseudomonas* à très faible concentration dans le but de modéliser des interactions de signalisation entre la plante et les bactéries. Nous avons ensuite extrait et analysé les métabolites produits par chacune des souches en présence et en absence des extraits racinaires dans le but d'évaluer l'impact des métabolites racinaires sur l'expression du métabolisme secondaire des *Pseudomonas* et par voie de conséquence sur leurs capacités phytobénéfiques.

Une deuxième partie de ces travaux a également évalué l'impact de la plante sur la production de biofilm des souches.

Une souche supplémentaire, la souche *Pseudomonas protegens* CHA0, a été incluse dans cette étude. Cette souche modèle a la capacité de produire de nombreux métabolites secondaires. De plus, l'impact de la plante sur sa production d'antimicrobiens a fait l'objet de plusieurs études antérieures, ce qui permettra de comparer nos résultats à la littérature (Rochat et al. 2010, de Werra et al. 2011, Jousset et al. 2010).

Ce travail est en cour de soumission dans le journal *eLife*

Partie A : Effet des métabolites racinaires de blé sur le métabolisme secondaire des *Pseudomonas*

A cross metabolomics approach shows that wheat interferes with fluorescent *Pseudomonas* physiology through its root metabolites

Laura Rieusset, Marjolaine Rey, Florence Gerin, Florence Wisniewski-Dyé, Claire Prigent-Combaret, Gilles Comte*

Université de Lyon, Université Claude Bernard Lyon1, Ecologie Microbienne, CNRS UMR-5557, INRAe UMR-1418, VetAgroSup, 43 Boulevard du 11 novembre 1918, 69622 Villeurbanne, France

Running title: Wheat can interfere on *Pseudomonas* production of secondary metabolites

*Corresponding author: UMR CNRS 5557 Ecologie Microbienne, Université Lyon 1, 43 bd du 11 Novembre 1918, 69622 Villeurbanne cedex, France. Phone +33 4 72 44 82 05. E-mail: gilles.comte@univ-lyon1.fr

Abstract

The plant root adhering soil houses an important microbial community. Roots exude a wide variety of secondary metabolites able to attract and/or control a large diversity of microbial species. In return, among the root microbiota, some bacteria are able to promote plant development, using plant growth-promotion and plant protection properties. These bacteria are named PGPR for Plant Growth-Promoting Rhizobacteria. Some PGPR belong to the *Pseudomonas* genus. *Pseudomonas* are known to produce a wide diversity of secondary metabolites that could have biological activity on the host plant and other soil microorganisms. Nevertheless, the impact of the host plant on *Pseudomonas* secondary metabolism is still poorly understood. In order to decipher how plant modulate *Pseudomonas* secondary metabolism, a cross metabolomic approach was developed. Five different fluorescent *Pseudomonas* strains were thus cultivated in the presence of a low concentration of root extracts recovered from one of the three wheat genotypes. This experimentation allowed us to evaluate the impact of root metabolites on *Pseudomonas* secondary metabolism. Analysis of our metabolomic workflow revealed that the production of several *Pseudomonas* secondary metabolites was significantly up- or down-regulated when bacteria were cultivated with root extracts. This shows that wheat root metabolites may act as signal compounds and modulate *Pseudomonas* secondary metabolism, including metabolites involved in plant stimulation and plant protection properties. Interestingly, root extract modulation differs according to wheat genotypes and *Pseudomonas* strains.

Keywords: *Pseudomonas*, wheat, secondary metabolites, plant-bacteria interaction, metabolomic, signaling, rhizosphere

Introduction

Plant roots secrete a large range of primary (i.e. organic acids, carbohydrates and amino acids) and secondary metabolites (i.e. alkaloids, terpenoids and phenolic derivatives) (Venturi and Keel 2016). Metabolic content of roots is dependent on plant species, but even plant genotypes, as well as biotic or abiotic interactions occurring in the rhizosphere (Bulgarelli et al. 2015, Bouffaud et al. 2014, Bais et al. 2006). Moreover, this exudation may represent up to 20% of the carbon fixed by photosynthesis (Huang et al. 2019; Voges et al. 2019). Through exudation of these compounds into the surrounding soil, roots interact with a wide range of microorganisms to form the rhizosphere microbial community (Brink 2016). Shaping of the so-called rhizo-microbiota is carried out by trophic interactions thanks to available carbon and nitrogen in root exudates and/or by signaling (Cotton et al. 2019, Sasse et al. 2018). The latter can be described as a process affecting the rhizo-microbiota through the detection and non-trophic biological responses of the microorganisms to low molecular weight compounds (Venturi and Keel 2016, Stringlis et al. 2018).

Among this microbiota, some bacterial strains called Plant-Growth Promoting Rhizobacteria (PGPR), exert beneficial effects on plant growth, development and/or health (Vacheron et al. 2013). It has been demonstrated that different plant genotypes do not similarly interact with the same potential plant-beneficial bacteria (Weller et al. 2007; Almario et al. 2013; Vacheron et al. 2016; Hu et al. 2018; Cotton et al. 2019; Valente et al. 2020). In addition to the selection of specific plant-beneficial strains, assessing the impact of the plant on physiological functions of PGPRs appears of great concern (Venturi and Keel 2016). Although signaling is well described in mutualistic interactions between *Rhizobia* and leguminous plants (Bais et al. 2006) or between *Frankia* and *Alnus* (Hay et al. 2017), signaling effects of plant root metabolites on PGPR physiology and on the metabolites they may release in the surrounding medium is still poorly documented. However, considering that rhizosphere biotic interactions are mediated by secondary metabolites, investigation on how plant may interfere with PGPR secondary metabolism is a critical issue.

In this work, we developed a cross metabolomic analysis to evaluate the impact of plant root secondary metabolites on the physiology and secondary metabolism of five bacterial strains. This was conducted with three wheat genotypes and five *Pseudomonas* strains.

Pseudomonas strains considered in this study were *P. koreensis* JV222, *P. chlororaphis* JV395B and *P. chlororaphis* JV497 isolated from soil or maize roots as well as *P. kilonensis* F113 and *P. protegens* CHA0 isolated from sugarbeet and tobacco rhizospheres, respectively (Stutz et al. 1985, Shanahan et al. 1992, Vacheron et al. 2016). PGPR belonging to the *Pseudomonas* genus are well studied rhizosphere strains (Weller et al. 2007, Vacheron et al. 2016), interacting with plants and microbial communities thanks to the biosynthesis and release of bioactive secondary metabolites (Besset-Manzoni et al. 2018). They produced a wide range of antimicrobial compounds like 2,4-diacetylphloroglucinol (DAPG), pyoluteorin, phenazine or pyrrolnitrin involved in plant protection, as well as indolic derivatives and signaling compounds involved in plant growth stimulation and plant-bacteria interaction (Gros and Lopper 2009, Brazelthon et al. 2008, Spaepen et al. 2007).

Our wheat-*Pseudomonas* metabolomic study highlighted that wheat root extracts from the three genotypes contained numerous detected metabolites, with several differentially produced according to wheat genotypes. Moreover, we showed that root extracts from all genotypes strongly influenced secondary metabolism of all *Pseudomonas* strains and that there was a complex modulation of *Pseudomonas* secondary metabolism according to plant genotypes x strains interaction.

Results

Characterization of root extracts from wheat genotypes

To examine the impact of genotypes on the wheat root metabolome, we profiled methanol root extracts by UHPLC-Q-TOF mass spectrometry. This untargeted analysis identified, after data filtration, a total of 1640 ions corresponding to 781 metabolites for all genotypes. Unsupervised principal component analysis of all metabolites revealed that wheat genotypes had major impacts on root metabolome. The 3 genotypes can be separated by the first two axes of the principal component analysis (**Figure 1A**) showing that they are able to produce different secondary metabolites or identical metabolites in different proportions. Component 1, explaining 21.1% of the variation in the data, separated genotypes Adular (A) and Soissons (S). Component 2, which explains 16.3% of the variation in the data, separated Bordeaux (B)

samples from the two other genotypes. Univariate statistical analysis on ion abundances was used to identify metabolites that significantly differed between samples (**Figure 1B**). Among the 781 metabolites detected in wheat genotypes extracts, 479 were produced in the same proportions according to wheat genotypes, while 302 metabolites were differentially produced depending on genotypes (**Figure 1B**). Most of these metabolites were produced by all genotypes, but in different proportions. Metabolites diversity was approximately the same for all genotypes and every genotype overproduced at least 50 specific metabolites. Nevertheless, Adular and Bordeaux shared the most important number of metabolites, showing that the metabolomes of these 2 genotypes were close to each other.

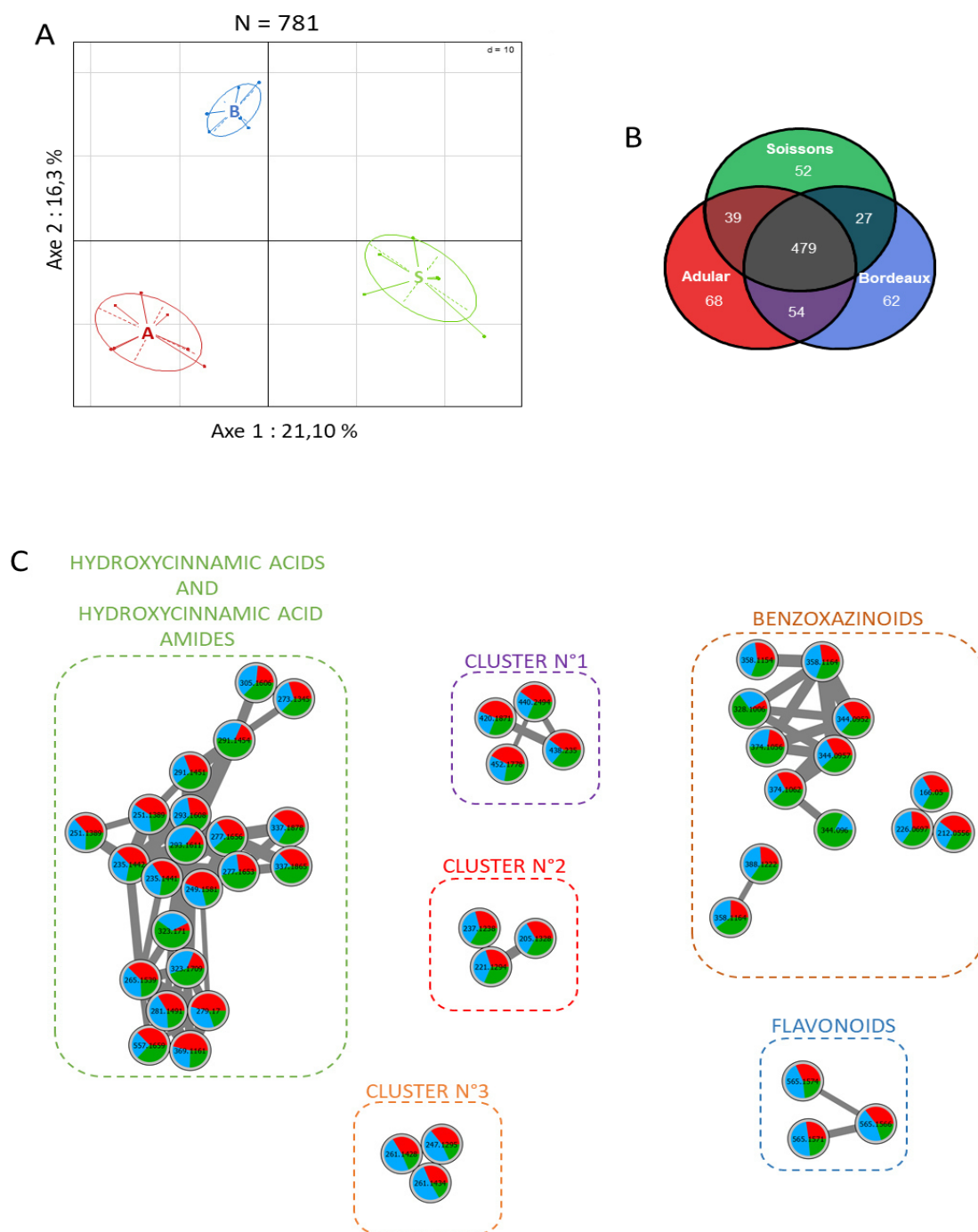


Figure 1: Principal component analysis obtained from LC–HRMS profiles of root extracts of the three wheat genotypes Adular (A), Bordeaux (B) and Soissons (S), based on ion intensity in positive ionization mode expressed in relative ion intensity. Wheat root secondary metabolomes are displayed following PC1 = 21.1 % and PC2 = 16.3% ($n = 21$ samples; 781 molecular ions) (**A**). Venn diagram represents wheat secondary metabolites significantly overproduced according to wheat genotypes ($P \leq 0.05$; Kruskal Wallis no parametric test corrected for false discovery) (**B**). Generation of a molecular network from MS/MS analyses of methanol extract of wheat genotypes Adular, Bordeaux and Soissons. Node identification correspond to parent ions masses $[M+H]$ and pie-charts show production of metabolites according to wheat genotypes. In order to enhance visibility, only clusters that presented more than three nodes were conserved on the molecular network (**C**).

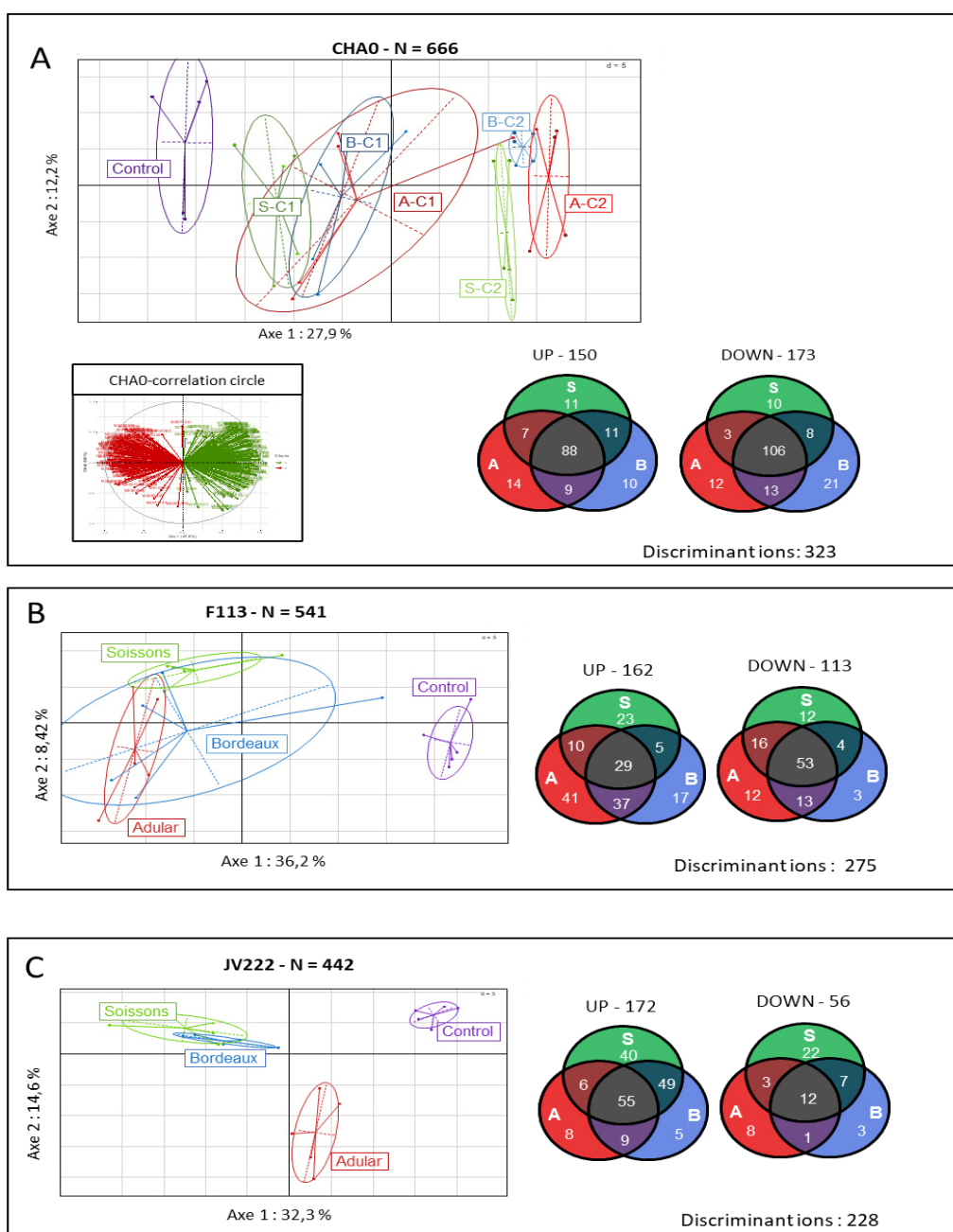
Wheat root secondary metabolites were identified thanks to a molecular networking approach (**Figure 1C, Table S1**) that can cluster compounds belonging to the same chemical family according to their MS/MS fragmentation. The most represented chemical group was hydroxycinnamic acid derivatives, with 23 compounds annotated (**Figure 1C**). Most compounds were hydroxycinnamic acid amides, namely feruloyl or coumaroyl linked with aliphatic amine like putrescine, agmatine or cadaverine (**Table S1**). Another major class of wheat secondary metabolites was benzoxazinoid derivatives. Thirteen benzoxazinoid derivatives were detected in chemical extracts. Some of them were identified as HBOA, DIMBOA, DHBOA, DIBOA, HMBOA, HDMBOA glycosylated or not and their degradation product MBOA (**Figure 1C, Table S1**). Three flavonoid derivatives were also found in wheat extracts, as well as amino acids like tyrosine, tryptophan or methyl-proline (**Figure 1C, Table S1**). The majority of these compounds were produced by all wheat genotypes in different proportions, and only one benzoxazinoid derivative was only produced by genotype Soissons and Bordeaux (**Figure 1C, BX4 on Table S1**).

Pseudomonas secondary metabolism modifications in response to wheat root extracts

Wheat root secondary metabolites from the 3 genotypes were put in contact with five rhizosphere-colonizing *Pseudomonas* strains by adding root chemical extracts to MM medium at very low concentrations (i.e. 50 µg/mL and 25 µg/mL). Cultivation of *Pseudomonas* strains in a minimal medium complemented with root extracts at 50 µg/mL without any other carbon source does not allow any bacterial growth (**Figure S1A**). However, when the same experiment was done in presence of a carbon source (i.e. fructose, MMF medium), a significant increase of the absorbance at 600 nm was observed (**Figure S1**). Thus, any bacterial response to wheat root metabolites under these conditions could not be attributed to a trophic interaction but rather to a signaling effect.

Then the influence of root extracts at 50 and 25 µg/mL on *Pseudomonas* secondary metabolome was analysed. *Pseudomonas* culture supernatants were extracted by ethyl acetate and analysed by UHPLC-Q-TOF mass spectrometry. This untargeted analysis identified 666 ions in *P. protegens* CHA0 culture; 541 in *P. kilonensis* F113; 442 in *P. koreensis* JV222; 534 in *P. chlororaphis* JV497 and 497 in *P. chlororaphis* JV395B (**Figure 2**). A principal component analysis of all ions from every strain showed that replicates from all conditions were well clustered and that the control samples were separated from other conditions according to the

first axis that represents 27.9%, 36.2%, 32.3%, 21.9% and 33.5% of variations in the data from CHA0, F113, JV222, JV497 and JV395B supernatants, respectively (**Figure 2**). Furthermore, addition of wheat extracts at 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (C2) lead to more profound metabolic modifications than the 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ treatment (C1), highlighting a concentration dependent effect (**Figure 2A**; **Figure S2**). Finally, a principal component analysis performed on all ions from the JV222 supernatants allowed to separate the JV222 metabolome under Adular influence from the other modalities, on the second component which explained 14.6% of variability (**Figure 2C**; **Figure S2B**).



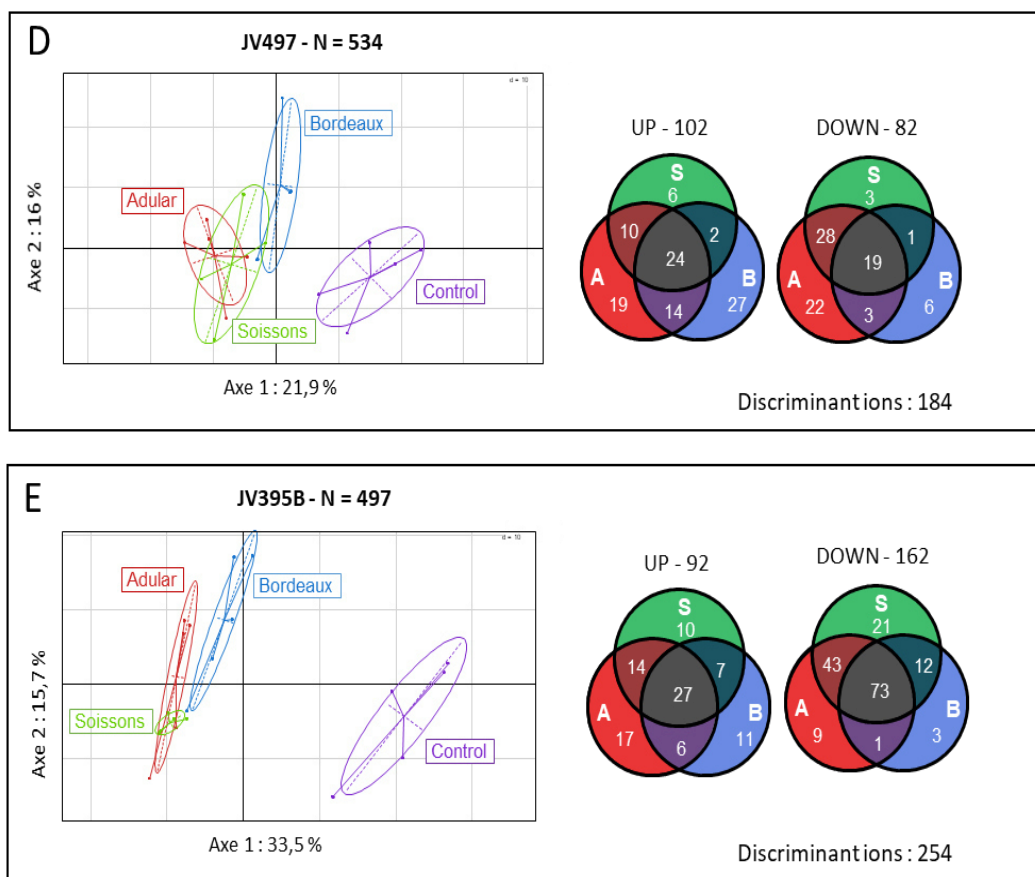


Figure 2: Principal component analysis obtained from LC–HRMS profiles of *Pseudomonas protegens* CHA0 **(A)**, *Pseudomonas kilonensis* F113 **(B)**, *Pseudomonas koreensis* JV222 **(C)**, *Pseudomonas chlororaphis* JV497 **(D)** and JV395B **(E)** cultivated in MMF medium complemented with wheat root extract at 50 µg/mL after 6 days incubation. All principal component analyses were associated with Venn diagrams representing proportions of *Pseudomonas* secondary metabolites significantly over and underproduced in presence of Adular (A), Soissons (S), or Bordeaux (B) root extracts against control ($P \leq 0.05$; Wilcoxon non parametric test corrected for false discovery). Principal component analysis obtained from CHA0 culture extracts showing CHA0 metabolomes under influence of wheat extract at 25 (C1) and 50 µg/mL (C2) highlighted concentration dependent effects of wheat extracts **(A)**. The correlation circle associated with the principal component analysis in case of the CHA0 strain represents metabolites implication in sample separation **(A)**.

The separation of strain samples under the influence of plant extracts from the control conditions may signify that wheat metabolites triggered the production of new bacterial compounds or modulated the production of bacterial metabolites in *Pseudomonas* strains. *Pseudomonas* metabolites whose production was modified in the presence of root extracts were represented on the correlation circles associated to the principal component analyses (example for CHA0, Figure 2A). Statistical univariate analysis on all these metabolites showed that the production of numerous compounds was significantly altered ($P \leq 0.05$) in response to root extracts from the three genotypes when compared to the control condition, for every

tested strain (**Figure 2: Venn diagrams**). For *P. protegens* CHA0, a total of 323 metabolites representing 48.4% of the metabolome were significantly altered in response to at least one genotype with approximately equal numbers of metabolites that are over or underproduced. Other strains, *P. kilonensis* F113, *P. koreensis* JV222, *P. chlororaphis* JV395B and *P. chlororaphis* JV497 were also impacted with respectively 50.8%, 51.5%, 51.1% and 34.5% of their metabolites significantly altered in the presence of root extracts (**Figure 2**). The impact of root extracts was not identical on all strains: JV395B underproduced most of its metabolites in response to wheat extracts, while JV222 overproduced a major part of them. Moreover, extracts from different genotypes altered the production of a different number of bacterial metabolites in every strain. In CHA0 cultures, the majority of responsive secondary metabolites was altered by the 3 wheat extracts, but genotype Bordeaux lead to the underproduction of the largest number of bacterial compounds. By contrast, F113 overproduced most of its metabolites only under the Adular extract while JV222 was mostly influenced by the Soissons extract. However, comparison of metabolites abundance under influence of wheat genotypes (i.e. Adular vs Soissons; Adular vs Bordeaux and Bordeaux vs Soissons) did not show any significant differences except for strain JV222 and for only two metabolites produced by JV395B. This suggests that, for strains CHA0, F113, JV395B and JV497, the 3 wheat genotypes induced similar responses but with different intensities. By contrast in JV222, 26.4% of their metabolites were differentially altered in presence of genotypes Adular or Soissons (**Figure 2C**). In short, root extract induced important metabolic modifications in all studied *Pseudomonas* strains, with complex specificities according to strains and genotype extracts.

Focus on secondary metabolites implicated in plant-bacteria and bacteria-bacteria interactions

		F113			JV222			JV395B			JV497			CHA0		
		A	B	S	A	B	S	A	B	S	A	B	S	A	B	S
ANTIMICROBIAL COMPOUNDS	PYOLUTEORIN												**	**	ns	
	PYRROLNITRIN							*	*	**	**	ns	ns	*	*	ns
	PHLOROGLUCINOL	Monoacetylphloroglucinol	**	**	*									ns	ns	ns
		2,4-diacetylphloroglucinol	**	**	**									ns	ns	ns
	PHENAZINE DERIVATIVES	Hydroxyphenazine						**	ns	**						
		Phenazine-1-carboxylic acid						**	**	**	ns	ns	ns			
		Hydroxyphenazine-1-carboxylic acid						**	ns	**						
Phenazine-1-carboxamide										**	ns	*				
SIDEROPHORES	PYOCHELIN DERIVATIVES	Dihydroaeruginol											**	**	**	
		Dihydroaeruginic acid											**	**	**	
		Aeruginic acid											**	**	**	
		Dihydroaeruginaldehyde											*	*	*	
		Enantio-pyochelin-I											**	**	**	
		Enantio-pyochelin-II											**	**	**	
	PDTC	m/z198	**	**	*											
	m/z 228: Pyridine-2,6-di-S-methyl esters	**	**	**												
AUXINE DERIVATIVES	Indole-3-lactic acid	**	*	*	**	*	*									
	Indole-3-carboxylic acid	*	ns	*	ns	ns	ns									
	Indole-3-acetic acid	**	**	**	ns	ns	ns									
ACYL-HOMOSERINE LACTONES	C4-HSL						**	*	*	**	*	**				
	3-OH-C6-HSL						**	*	**	**	**	**				
	3-oxo-C6-HSL						**	*	**							
	C6-HSL						**	*	**	ns	ns	ns				
	3-OH-C8-HSL						**	*	*	**	**	**				
m/z 280: Acetyl-3,4-dihydro-5-methyl-4-alkyl(C11:0)-2H-pyrrole		**	**	**												
m/z 238: 3,4-dihydro-5-methyl-4-alkyl(C11:0)-2H-pyrrole		**	**	**												
m/z 264: 3,4-dihydro-5-methyl-4-alkenyl(C13:1)-2H-pyrrole		**	*	*												



Figure 3: Influence of wheat root extracts on *Pseudomonas* secondary metabolites involved in plant-bacteria or bacteria-bacteria interactions. Heatmap projections represent Log₂ fold changes in relative metabolite intensities between *Pseudomonas* strains cultivated with root extracts from wheat genotypes (Adular: A, Bordeaux: B or Soissons: S) and control. Statistically significant values against control ($P \leq 0.05$; Wilcoxon non parametric test corrected for false discovery) were represented by: *: $P \leq 0.05$ or ** $P \leq 0.01$. Green indicates metabolites with a greater intensity in presence of root extracts while red indicates metabolites with a greater abundance in absence of root extracts. White indicated absence of metabolite production in corresponding strains.

Many of the secondary metabolites whose production was appeared to be altered in response to wheat root extracts are implicated in plant-bacteria or/and bacteria-bacteria interactions (**Figure 3**). *Pseudomonas* strains are able to produce a large panel of antimicrobial compounds (i.e. pyoluteorin, pyrrolnitrin, 2,4 diacetylphloroglucinol and phenazines). Pyoluteorin, pyrrolnitrin and phloroglucinols were not impacted or were underproduced in response to wheat extracts (**Figure 3**). Some differences can be highlighted according to productive strains. For example, DAPG was significantly underproduced by F113 while its production was not significantly impacted in CHA0. It is nevertheless relevant to note that, in our culture conditions, the production of DAPG was lower in CHA0 compared to F113, even when the latter was grown in presence of root extracts. The production of pyrrolnitrin was 4-fold reduced in JV395 while not significantly impacted in CHA0 (**Figure 3**). Lastly, phenazines, produced by *P. chlororaphis* strains, did not share the same behaviour as the other antimicrobial compounds (**Figure 3**). Indeed, the production of phenazines originating from a similar biosynthetic pathway was not altered in the same way in response to root extracts. In *P. chlororaphis* JV395B, the first phenazine derivative (i.e. phenazine-1-carboxylic acid (PCA)) was significantly underproduced in presence of wheat extracts, while other phenazine derivatives (produced thanks to the monooxygenase PhzO) were overproduced (**Figure 4**). Nevertheless, significant differences according to wheat genotypes were observed. Indeed, Adular and Soissons extracts led to overproduction of the last derivatives of the pathway (OH-phenazine) while the intermediate (OH-PCA) was overproduced only in response to the Bordeaux extract. *P. chlororaphis* JV497 also responded to wheat extracts by overproducing the last derivative of its biosynthesis pathway, phenazine-1-carboxamide (**Figure 4**).

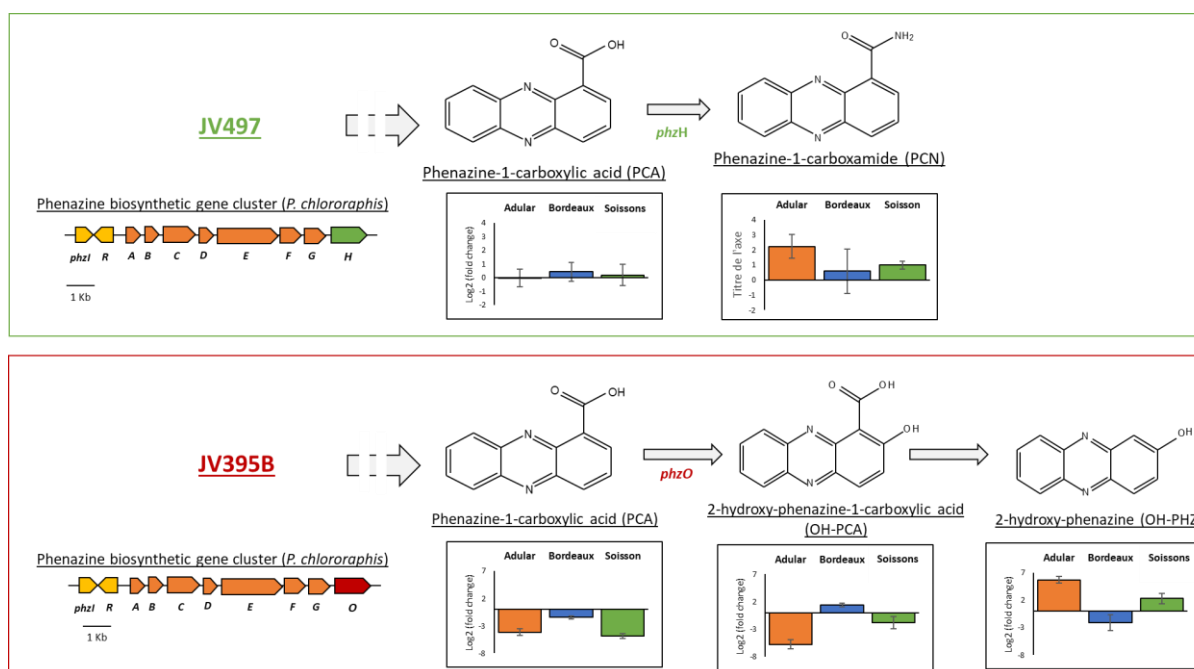


Figure 4: Plant metabolites interfere with biosynthesis of phenazine-1-carboxylic (PCA) derivatives. Phenazine biosynthetic pathway adapted from Chin-A-Woeng et al. (2003) and organization of the phenazine biosynthetic operon in *Pseudomonas chlororaphis* JV497 and JV395B, associate with Log2 fold changes in relative metabolite intensities of phenazine derivatives between *Pseudomonas* cultures in presence of wheat root extracts and in absence of the root extracts (control conditions) (n=6).

Regarding enantio-pyochelins biosynthesis pathway found exclusively in *P. protegens* CHA0 (**Figure 5**), enantio-pyochelin immediate precursor and its derivatives (i.e. dihydroaeruginic acid, aeruginic acid, dihydroaeruginol and dihydroaeruginolaldehyde; **MS/MS fragmentation in Figure S3**) were overproduced in response to wheat extracts, while both enantio-pyochelins I and II were underproduced. Finally, auxin derivatives produced by *P. kilonensis* F113 and *P. korensis* JV222 were also differentially modulated by root extracts. Indole-3-lactic acid was overproduced by both strains in response to wheat extracts whereas indole-3-acetic acid was underproduced by F113 and not impacted in JV222. Interestingly, JV222 production of indole-3-carboxylic acid and indole-3-lactic acid was not impacted in the same way depending on the genotype used to obtain root extracts. The Adular extract led to an augmentation of indole-3-lactic acid level while the Soissons extract led to an increase of indole-3-carboxylic acid level (**Figure 3**).

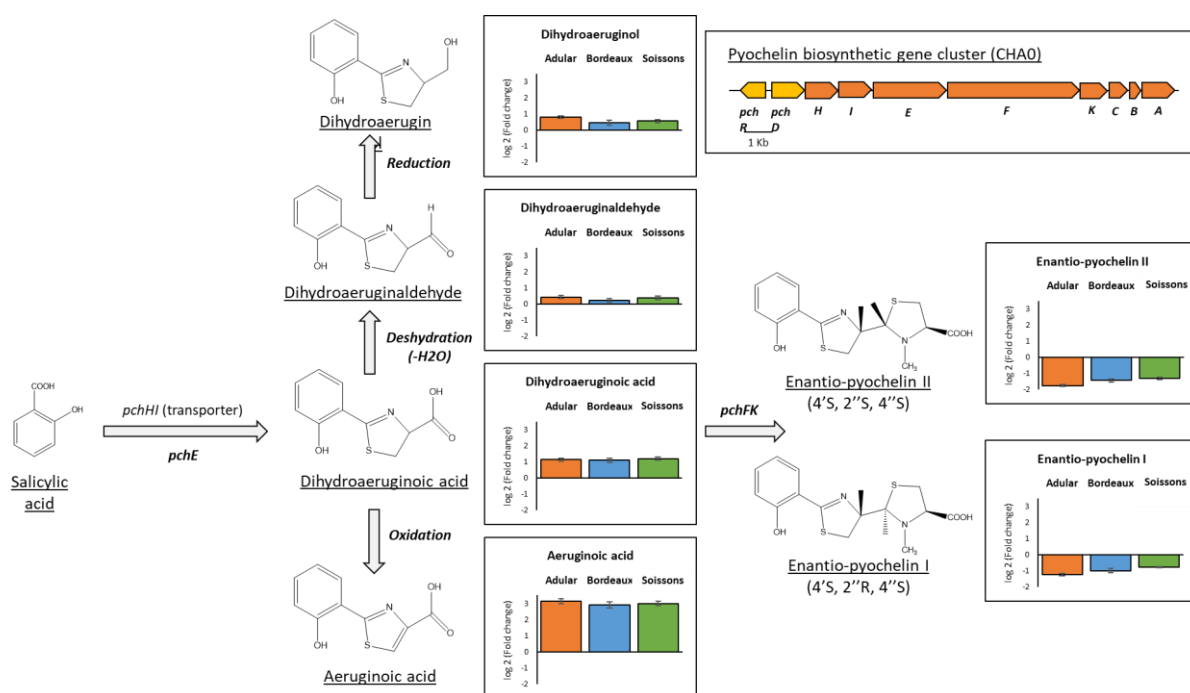


Figure 5: Plant metabolites interfere with biosynthesis of pyochelin. Pyochelin biosynthetic pathway adapted from Ye et al. 2014 and organization of the pyochelin biosynthetic operon in *Pseudomonas protegens* CHA0, associate with Log₂ fold changes in relative metabolite intensities between *Pseudomonas* cultures with wheat root extracts and in absence of the root extracts (control conditions)(n=6).

In addition, all quorum sensing mediators belonging to the *N*-acyl-homoserine lactone (AHL) family were overproduced by both *P. chlororaphis* strains in response to wheat extracts from all genotypes. For example, 3-OH-C₆-HSL was approximately 3 times more produced in response to wheat extracts. Only C₆-HSL production by JV497 was not significantly impacted (**Figure 3**).

Moreover, apart from these bacterial secondary metabolites, well-known to be involved in bacteria-bacteria interactions, two newly described families of F113 secondary metabolites were significantly overproduced in response to root extracts. On one hand, the production of two pyridine-2,6-thiocarboxylic derivatives (PDTC) *m/z* 198 and *m/z* 228 (Rieusset et al. 2020) was increased in response to plant extracts; for example, the *m/z* 198 compound was 930-, 927- and 358-fold overproduced in the presence of Adular, Bordeaux and Soissons extracts respectively (**Figure 3**). On the other hand, the production of three atypical compounds described as acyl-dihydro-methyl-pyrrol derivatives, was also strongly influenced by root extracts (Rieusset et al. 2020). The derivative whose synthesis was mostly affected is the *m/z* 280 compound, with a 46-, 29- and 44-fold overproduction in presence of Adular, Bordeaux and Soissons extracts, respectively (**Figure 3**).

Discussion

Wheat roots exude a large diversity of primary and secondary metabolites that can interact with the rhizomicrobiota. Plant can shape root microbiota and interfere with bacterial physiology (Voges et al. 2019; Stringlis et al. 2018; Mark et al. 2005). Previous studies have investigated the impact of primary metabolites or purified secondary metabolites on bacterial gene expression (Mark et al. 2005; Lim et al. 2013; De werra et al. 2011). In our study, through a cross plant-bacteria metabolomics approach, we evaluated the impact of secondary metabolites from 3 wheat genotypes on secondary metabolites produced by 5 rhizobacterial *Pseudomonas* strains.

Wheat root metabolites differ depending on plant genotypes

781 metabolites were detected in root extracts from the 3 wheat genotypes (**Figure 1**). Among these, 61.3% were common and produced in identical proportions in all genotypes. Differences between genotypes concern mostly quantitative variations of common compounds. Only a few compounds were specific to a genotype, such as the BX4 benzoxazinoid detected only in the Soissons and Bordeaux genotypes (**Table S1**). Several plant metabolites can be clustered on the molecular network, indicating that they share closely related chemical structures and thus belong to the same molecular families (**Figure 1C**, Watrous et al. 2012, Olivon et al. 2018). Most of them are phenolic compounds already described as the most representative class of compounds in wheat (Dinelli et al. 2011).

The main cluster gathered 23 metabolites belonging to hydroxycinnamic acid (HCAs) and hydroxy cinnamic acid amides (HCAAs) (**Figure 1C**). HCAs and HCAAs belong to an important class of phenylpropanoid metabolites, HCAs being the most studied. They can be released in the rhizosphere and have biological activity on rhizobacteria. For example, it has been demonstrated that HCAs are able to regulate *Agrobacterium* virulence on tomato (Meyer et al. 2018). HCAAs are found in plant seeds and roots where they are involved in plant defense, cell division, senescence or stress response (Macoy et al. 2015, Hausler et al. 2014). Accumulation of some HCAAs in response to PGPR inoculation has also recently been described in rice roots (Valette et al. 2020). Flavonoids such as apigenin derivatives (i.e.

schaftoside, [Dinelli et al. 2011](#)) were also detected in wheat root extracts (**Figure 1C**). This kind of secondary metabolites has been shown to be important bioactive secondary metabolites in the rhizosphere ([Wu et al. 2001](#)). Next to their pivotal role in the establishment of the *Rhizobia*-Leguminous plant symbiosis and in the initiation of tumorigenesis by *Agrobacterium* ([Bhattacharya et al. 2010](#)), some flavonoids may also play a role in association between cereals and PGPR ([Chamam et al. 2015](#)).

Another cluster grouped 13 compounds belonging to the benzoxazinoid family (**Figure 1C**). The relative quantification demonstrated a contrasted accumulation according to wheat genotypes (**Table S1**), revealing that the 3 genotypes displayed a differential benzoxazinoid fingerprint. Nevertheless, MBOA that was previously described as an active degradation product of benzoxazinoids ([Hu et al. 2018](#), [Cotton et al. 2019](#)) was produced in identical proportions in all genotypes. Benzoxazinoids constitute an important class of specialized metabolites in *Poaceae* ([Marti et al. 2013](#), [Batyshina et al. 2020](#)). There are particularly produced in young seedlings ([Glaser et al. 2011](#)) and associated with plant defense against insects or microbial pathogens ([Niemeyer et al. 2009](#)). However, benzoxazinoids do not always display a deleterious activity on micro-organisms; indeed, DIMBOA can attract the plant-associated bacterium *Pseudomonas putida*, that is then able to induce a defense priming effect on maize ([Neal et al. 2013](#)). Furthermore, a benzoxazinoids-conditioned microbiome was shown to be able to trigger a protecting feedback on maize ([Hu et al. in 2018](#)).

Finally, beside an important number of well-known secondary metabolites, most of wheat roots secondary metabolites remain to be annotated (**Figure 1**).

Global impact of plant root compounds on the biosynthesis of bacterial secondary metabolites via a signaling effect

The impact of root extracts from all genotypes (i.e. Adular, Bordeaux and Soissons) was tested at a low concentration (50 µg/mL) on five fluorescent *Pseudomonas* strains able to colonize the wheat root system. We demonstrated that all five strains are unable to use wheat extracts as a trophic source, as no growth was observed in the absence of fructose (**Figure S1A**). However, addition of these extracts to the MMF medium triggered physiological modifications on all strains, as shown by the enhancement of OD₆₀₀ absorbance (**Figure S1**). These results suggest that wheat extracts contain bioactive secondary metabolites and/or primary metabolites in

concentrations too small to sustain bacterial growth. Conversely, the bacterial response observed in fructose complemented medium suggests a signaling activity of wheat extracts on the five *Pseudomonas* strains, as confirmed by the analysis of *Pseudomonas* secondary metabolisms. Indeed, a principal component analysis performed on bacterial metabolome showed a separation from the control for each condition (**Figure 2**). Moreover, a concentration dependent effect has been highlighted thanks to the use of two plant extract concentrations (25 µg/mL and 50 µg/mL) (**Figure 2A, Figure S2**). As shown by the multivariate analysis that separates all conditions along axis 1, the presence of plant extracts was the most important factor explaining the variation of the data. The biological elicitation of secondary metabolite production has been shown previously in Actinobacteria ([Abdelmohsen et al. 2015](#)). Here, a similar result was observed with plant extracts from different wheat genotypes on *Pseudomonas* secondary metabolism. For example, the signaling effect of Adular on *P. kilonensis* F113 enhances the production of 36.3% of its excreted secondary metabolites (**Figure 2B**). Interestingly, all strains do not respond similarly to root extracts: the addition of root extracts triggered the overproduction of 75.4% of *P. koreensis* JV222 discriminant metabolites whereas the synthesis of 63.8% of *P. chlororaphis* JV395B metabolites was reduced (**Figure 2**).

Except for JV222 (discussed below), the influence of roots extracts from all three genotypes on each strain is observed on the first axis on the multivariate analysis and this segregation is due to identical variables on the corresponding correlation circles (**Figure 2A**). This suggests that extracts from all genotypes impacted similar bacterial metabolites. Venn diagrams (**Figure 2**) show the differential numbers of bacterial metabolites whose relative quantity differ according to the influence of wheat genotype; these differential numbers may be explained by discrepancies in root extracts composition, notably at the quantitative level. This cross metabolomic approach highlighted a very complex and tricky regulation of *Pseudomonas* bacterial secondary metabolism. For *P. koreensis* JV222, a contrasted response was observed according to wheat genotypes, with extracts from Adular and Soissons clearly impacting the synthesis of different JV222 metabolites (**Figure 2C**). This specific behaviour of JV222 could be correlated to the phylogenetic distance between this strain and the other *Pseudomonas* strains used in this study ([Vacheron et al 2016](#)). Moreover, this strain is known to

possess fewer biocontrol properties than the other studied strains that belong to the CPC (*P. corrugata*/*P. protegens*/*P. chlororaphis*) clade (Vacheron et al 2016).

Wheat root extracts interfere with the production of *Pseudomonas* secondary metabolites involved in biotic interactions.

In order to evaluate the impact of plant extracts on the expression of bacterial phytobeneficial properties, we focused our attention on bioactive secondary metabolites produced by the studied strains (Gross and Lopper 2009, Vacheron et al 2016). The five *Pseudomonas* strains have the capacity to produce secondary metabolites involved in plant-bacteria or bacteria-bacteria interactions, as well as in their adaptation to environment (Figure 3) (Spaepen et al. 2007, Price-Whelan et al. 2006, Couillerot et al. 2011). Among them, four strains *P. kilonensis* F113, *P. protegens* CHA0 and *P. chlororaphis* JV395B and JV497 were able to produce antimicrobial compounds (Rieusset et al. 2020, Jousset et al. 2011, Redundo-Nieto et al. 2013, Mavrodi et al. 2006). By contrast, the last strain *P. koreensis* JV222 could be considered as a phytostimulator strain as this bacterium is able to produce significant level of indole derivatives, including IAA (Rieusset et al. 2020). IAA production is an important phytostimulatory property of rhizosphere bacteria due to its role in root development and modulation of plant gene expression (Spaepen et al. 2007; Vacheron et al. 2013).

Root extracts have a complex effect on the biosynthesis of some bacterial secondary metabolites (Figure 3). Phenazine biosynthetic pathway is one of the most influenced by roots extracts leading to differential effects according to the compounds (Figure 3, figure 4). Phenazine derivatives, produced by *P. chlororaphis* strains JV395B and JV497, represent a large class of bacterial metabolites. Although phenazines are studied for their antimicrobial activity and their contribution in the protection of plants against pathogens (Mavrodi et al. 2006), they also play important roles in bacterial physiology through their siderophore properties and their effect on biofilm production and root colonization (Raaijmakers and Mazzola 2012; Price Welan et al. 2006; Mazzola et al. 1992). *P. chlororaphis* JV395B and JV497 possess phenazine biosynthetic gene clusters that allow the synthesis of PCA. The two gene clusters only differ by the terminal gene, *phzH* for JV497 and *phzO* for JV395B (Rieusset et al. 2020). *phzH* encodes a transaminase that allows transformation of PCA into PCN while *phzO* encodes a monooxygenase leading to the production of hydroxylated derivatives of PCA (i.e. OH-PCA and OH-Phz) (Chin-A-Woeng et al. 2003, Figure 4). In JV497, PCA production was not modified in

the presence of wheat extracts while PCN was overproduced in presence of extracts from Adular and Soissons genotypes (**Figure 4**). This suggests that the phenazine gene cluster was upregulated leading to the accumulation of PCN derivative. In JV395B, PCA was underproduced in presence of extracts from all genotypes while further biosynthetic derivatives were overproduced. Indeed, Bordeaux extracts triggered the overproduction of OH-PCA while Adular and Soissons extracts led to the overproduction of its decarboxylated derivative OH-Phz (**Figure 4**). Few studies have investigated the structure-activity relationship of phenazines. A more efficient conversion of PCA into OH-PCA revealed to promote the attachment of *Pseudomonas* strains on surfaces and to affect the architecture of mature biofilm (Maddula et al. 2008). Other authors suggest a role of extracellular DNA in biofilm structure under OH-PCA influence (Wang et al. 2016, Yu et al. 2018). Moreover, our previous study regarding *Pseudomonas* metabolic specificity in biofilm lifestyle showed that OH-PCA and OH-PHZ derivatives were strongly overproduced in biofilm conditions (Rieusset et al. 2020). Nevertheless, on both *P. chlororaphis* strains, Bordeaux plant extracts induced fewer modifications on phenazine production than the two other extracts (**Figure 4**).

In *P. chlororaphis* strains, quorum sensing (QS) is known to be implicated in regulation of phenazine production thanks to, at list, two regulation systems, *phzI/phzR* and *aurI/aurR* (Madula et al., 2008; Morohoshi et al., 2017, Rieusset et al. 2020). Indeed, wide majority of AHL derivatives were also overproduced by *P. chlororaphis* JV395B and JV497 strains in the presence of root extracts. AHLs are the most commonly described QS mediators in Gram negative bacteria (Keller and Surette 2006). QS is a cell density-dependent system that occurs via the production and response to QS signals (Flemming et al. 2016). This system regulates a wide range of bacterial phenotypes like virulence, biofilm production or secondary metabolites production (Waters and Bassler 2005). AHLs also may act as interkingdom signals as their application on plants lead to changes in protein profile (as observed in *Medicago trunculata*; Mathesius et al. 2003) and interference with root development, plant defense, stress response or metabolic regulation (Chagas et al. 2018). On the other hand, plant metabolites can also interfere with bacterial QS (Venturi and Keel 2016, Grandclement et al. 2016, Hartmann et al. 2009). As example, legume flavonoids increased AHLs production in rhizobia and consequently interfere with bacterial nodulation (Pérez-Montaña et al. 2011). In *P. chlororaphis*, plant increase of QS may enhance root colonisation through the increase of biofilm formation (Elias

and Banin 2012, Selin et al. 2010). Moreover, in addition to AHL system, QS could also be mediated by other signals. Actually, AHL receptors have also been discovered in bacteria unable to synthesize AHL and some of these receptors not only are unable to respond to AHLs but instead recognize plant molecules and regulate the expression of bacterial genes involved in phytostimulative or biocontrol properties (Gonzalez and Venturi 2013). Indeed, CHA0 possesses such a receptor, named PsoR, that specifically responds to wheat and rice (but not to cucumber) metabolites by activating the production of antimicrobial compounds, thus playing a key role in plant protection against pathogens (Subramoni et al. 2011).

Unlike phenazine derivatives, the production of another antimicrobial compounds was globally decreased in all *Pseudomonas* strains under the influence of root extracts (**Figure 3**). The influence of plants on the production of antimicrobial compounds has previously been investigated in CHA0 through a fluorescent reporter approach (De werra et al. 2011, Rochat et al. 2010, Jousset et al. 2011). First, the impact of 63 pure metabolites from plant and bacteria has been investigated on the *in vitro* expression of *phl* and *plt* operons (i.e. DAPG and pyoluteorin gene clusters) and most compounds could affect (positively or negatively) DAPG and pyoluteorin production (De werra et al. 2011). Second, *in planta* experiment on wheat showed that the expression of *phl* and *prn* (i.e. DAPG and pyrrolnitrin gene clusters) was induced by plant whereas expression of *plt* and *hcn* (i.e. pyoluteorin and HCN gene clusters) was not (Rochat et al. 2010). Finally, same *in planta* approach used by CHA0 inoculation on *Pythium* infected barley showed that *phlA* was upregulated only on infected plant (Jousset et al. in 2011). These studies showed that plant impact on CHA0 antimicrobial production depend on plant environment as well as root secondary metabolites. In our experiment, wheat genotypes have not been infected by fungal pathogens. We can suppose that wheat plant metabolites are not able to cause enhancement of antimicrobial production as pointed by Jousset et al. However, we should also consider that these compounds present signaling activity at sub-inhibitory concentration (Haas and Keel 2003; Venturi and Keel 2016). For example, DAPG, when applied at low concentrations, regulates auxin production in plants (Brazelton et al. 2008) but also in the biostimulant strain *Azospirillum brasilense* Sp245 (Combes-meynet et al. 2011). By lowering DAPG production, plant might favor the signaling effect of DAPG.

Wheat root extracts modify siderophore production and compounds whose role in plant-bacteria interactions remains to be investigated.

The pyochelin biosynthesis pathway was also impacted by wheat root extracts (**Figure 5**). Pyochelin is an important bacterial siderophore, able to chelate iron and deliver it into bacterial cells. Pyochelin biosynthesis begins by the transformation, via the product of the *pchE* gene, of salicylic acid into dihydroaeruginoic acid, the latter being then transformed into enantio-pyochelins through the products of *pchF* and *pchK* genes (Ye et al. 2014; Youard et al. 2007). Moreover, dihydroaeruginoic acid can be transformed into other derivatives. Our untargeted metabolomic analysis detected enantio-pyochelins I and II, but also aeruginoic acid, dihydroaeruginaldehyde and dihydroaeruginol (**Figure 5, Figure S3**). The production of these compounds was significantly modified in the presence of root extracts from all genotypes. Thus, the precursor dihydroaeruginoic acid and its derivatives (i.e. aeruginoic acid, dihydroaeruginaldehyde and dihydroaeruginol) were overproduced while both enantio-pyochelins were underproduced. Beside siderophore activity, pyochelin was also reported as a signaling compound that promotes systemic plant defense (Audenaert et al. 2002). A comparison of the biological activity of pyochelin and its precursors remains to be undertaken. Nevertheless Lee et al. in 2013 suggested that aeruginaldehyde might be a new QS mediator in *P. aeruginosa* (Lee et al. 2013) but authors of a more recent study refuted this hypothesis (Cornelis 2019).

Another siderophore, PDTC, can also be produced by F113 (Redundo-nieto et al. 2013). In this study we did not detect any PDTC that is known to be quite unstable in solution (Cortese et al. 2002). However, several PDTC derivatives (i.e. ester, thioester and acid derivatives of PDTC; Budzikiewicz et al. 1981) were detected in F113 culture supernatants (**Figure 3**). The detection of PDTC derivatives in F113 cultures suggests the potential ability of F113 to produce PDTC (Budzikievitz et al. 2003, Rieusset et al. 2020). Additional experiments using different solvents (ethanol and ethyl acetate) for extraction confirmed that the two derivatives *m/z* 228 and *m/z* 198 were actually produced by F113 while other derivatives (*m/z* 182; 196 and 212) resulted in artefacts due to methanol degradation (data not shown). These two PDTC derivatives (*m/z* 228 and 198) were the most impacted compounds by the presence wheat extracts (**Figure 3**). *m/z* 198 was for example more than 900 times overproduced in the presence of root extracts from Adular and Bordeaux genotypes. PDTC allows metal chelation in soil and has been described

in *Pseudomonas stutzeri* as useful for soil metallic depollution (Zawadzka *et al.* 2006) but has never been studied in the context of plant-microorganisms interactions.

Other compounds detected in the F113 supernatant that share quite similar mass spectra to compounds described as acetyl-3,4-dihydro-5-methyl-4-alkyl(C11:0)-2H-pyrrole, 3,4-dihydro-5-methyl-4-alkyl(C11:0)-2H-pyrrole and 3,4-dihydro-5-methyl-4-alkenyl(C13:1)-2H-pyrrole (Hildebrand and Budzikiewicz 1986) exhibited an overproduction in the presence of root extracts (**Figure 3**). These compounds were also strongly overproduced in biofilm colony lifestyle (Rieusset *et al.* 2020). Thus, the modulation of their production by plant compounds suggests that they could be involved in plant-bacteria interaction.

Secondary metabolites allow an organism to be adapted to biotic and abiotic environment (Wolfender *et al.* 2015). In this context, the differential production of *Pseudomonas* secondary metabolites reflects its physiological response to wheat root metabolites. Biological roles of most of these metabolites are still unknown. Moreover, some metabolites can interact with each other; phenazine production by *P. chlororaphis* strains is for example under control of AHLs (Morohoshi *et al.* 2017). Nevertheless, overview of wheat root impact on known *Pseudomonas* bioactive metabolites suggests enhancement of bacterial interaction mediators. Indeed, biosynthesis of antimicrobial compounds was mainly not impacted. They were even underproduced in presence of root extracts, suggesting that healthy wheat does not promote *Pseudomonas* antagonist activities against other microbes and/or plant. On the other hand, the antimicrobial low concentrations, the overproduction of signaling compounds like AHLs, as well as the overproduction of phenazine derivatives involved in biofilm architecture (i.e. OH-PCA) or of pyochelin precursor presenting signaling activity (i.e. aeruginaldehyde derivatives) suggest that plant metabolites induce signalisation process in the five studied *Pseudomonas* strains (Brazelton *et al.* 2008, Flemming *et al.* 2016, Maddula *et al.* 2008, Lee *et al.* 2013). These physiological changes can impact interactions of *Pseudomonas* strains with wheat itself as well as with other micro-organisms within the rhizomicrobiota.

Experimental procedures

Bacterial strains and media

This study was performed on five strains belonging to the fluorescent *Pseudomonas* group: *Pseudomonas kilonensis* F113 isolated in 1992 from the sugar beet rhizosphere (Shanahan et al. 1992), *Pseudomonas protegens* CHA0 from tobacco rhizosphere (Stutz et al. 1986) and three *Pseudomonas* strains isolated in our lab in 2013 (Vacheron et al. 2016) from bulk soil in maize planted fields, *Pseudomonas chlororaphis* JV395B and JV497 and *Pseudomonas koreensis* JV222. *Pseudomonas* strains were routinely grown in King's B (KB) agar medium (King et al. 1954), Luria Bertani (LB) broth medium (Bertani, 1951) at 28°C and Minimum medium (MMF) which is composed of one carbon source fructose (14,4 g/L) ; NH₄Cl (1 g/L) ; KH₂PO₄ (1,36 g/L) /K₂HPO₄ (1,74 g/L) ; MgSO₄ (0,8 g/L) and a mix of 15 amino acid (alanine, arginine, asparagine, aspartic acid, cysteine, glutamic acid, glycine, histidine, isoleucine, leucine, phenylalanine, threonine, tryptophan, tyrosine, valine; at 0.01 mg/mL each).

Extraction of wheat root metabolites

Root metabolites were collected from three wheat (*Triticum aestivum* L.) genotypes, Bordeaux 13 7973 (INRA Clermont-Ferrand GEDEC), Adular 797 (INRA Clermont-Ferrand GEDEC) and Soissons 6607 (INRA Clermont Ferrand GEDEC) grown in 2-dm³ jars containing non-sterile, sieved (Ø 4 mm, sieve mesh size) loamy soil (16.2% clay, 43.9% silt and 39.9% sand, pH 7.0, in water; 2.1% organic matter; El Zemrany et al., 2006) from the surface horizon of a luvisol at the experimental farm of La Côte St André near Lyon (France). Each jar contained 3 seeds, and 7 jars were used for each treatment (n = 21). The jars were randomly placed in a glasshouse at 20°C with a 16: 8 h day: night photoperiod (relative humidity 45% during the day and 65% at night). Soil was watered to 20% (w/w) water content. At 21 d after planting, plants were dug up and soil that did not adhere to roots was discarded. Each plant roots system and adhering soil were dipped into liquid nitrogen to avoid enzymatic reactions and freeze-dried by lyophilisation (Alpha 1-4 LSC Christ, Osterode, Germany).

For metabolites extraction, freeze-dried roots were each placed in an Eppendorf tube, soaked into liquid nitrogen was added. Roots were crushed using a ball mill (TissueLyser II; Qiagen, Courtaboeuf, France). Before extraction, 3 roots were randomly pooled leading to 7 replicates per condition. Extraction was realized using 1.5 mL methanol for 150 mg of dry sample by 10 min agitation at 150 g and 10 min sonication, centrifugation and recovery of the

supernatant. The extraction was performed twice, and extracts were pooled and dried using a Speedvac-assisted evaporation (Labconco, Kansas City, MO, USA). Each sample was then re-suspended in methanol in order to obtain a concentration of 10 mg/mL.

Evaluation of the effect of wheat root extracts on Pseudomonas growth and on production of secondary metabolites

First, the influence of the root metabolites collected from wheat genotypes, Adular 797, Bordeaux 13 7973 and Soissons 6607 on the growth of *P. kilonensis* F113, *P. protegens* CHA0, *P. chlororaphis* JV395B, *P. chlororaphis* JV497 and *P. koreensis* JV222 was performed using the bioscreen device (Labsystems, Helsinki, Finland) in MM medium supplemented or not with fructose (i.e. MMF and MM). Bacterial inoculants were obtained after an overnight growth in LB medium and two washes with MM broth. MM and MMF were supplemented with wheat extracts at 50 µg/mL (1% methanol). Methanol and uninoculated medium were used as controls leading to 42 conditions. The experimentation was carried out in bioscreen plates (2 X 100 wells). Lastly, 190 µL of MM and MMF were inoculated with 10 µL of preculture leading to an initial population of $5 \cdot 10^6$ UFC/mL in 200 µL of culture per wells. Then, plates were incubated in a bioscreen automate with agitation at 28°C. Optical density (OD) at 595 nm of the cell suspensions was automatically read at regular intervals of 20 min, over 3 days.

Thus, the influence of the root metabolites collected from the 3 wheat genotypes on the 5 *Pseudomonas* strains metabolome was performed with bioscreen in MMF medium supplemented with wheat extracts at 25 µg/mL and 50 µg/mL (1% methanol) according to same protocol as bacterial growth evaluation over a 6 days period. Methanol and uninoculated medium were also used as control leading to 42 conditions. All 42 conditions were performed in 5 replicates ($n = 5$) leading to a total of 210 samples. After 6 days, 200 µL cultures from each of 210 samples were transferred in Eppendorf® and extracted with 200 µL of ethyl acetate. Liquid/liquid partition was achieved by 15 min of agitation and recovery of the upper organic phase after a 5 min-rest. The extraction protocol was repeated once more, giving a total volume of extract of 400 µL per sample. After that, the organic phase (ethyl acetate) was dried using a SpeedVac (Labconco, Kansas City, MO, USA). Dried extracts were suspended in 30 µL of methanol and centrifuged for 5 min at 12 000 g. Thirty microliters were then transferred in vials for LCMS analysis. A quality-control (QC) sample was prepared by mixing 1 µL of each sample

previously described (210 samples) in order to control analytical repeatability during UHPLC-MS analysis.

LC-HRMS analysis

Wheat and bacterial extracts were analysed on Agilent technologies® Accurate-Mass Q-TOF LCMS 6530, with LC 1290 Infinity system. The separation was carried out at 40°C using a 120 EC-C18 column (3.0 X 100mm X 2.7 µm; Agilent Poroshell). Each sample (3 µl) was injected at the head of the column, and the column was eluted at 0.7 mL/min with a solvent gradient using solvent A (water with formic acid 0.4% (v/v)) and solvent B (acetonitrile). The gradient for wheat extracts consists in increasing proportion of solvent B, step by step, from 1% to 15% during 8 min; 15% to 100% during 8.5 min, followed by a 4 min isocratic phase with 100% solvent B; back from 100 % to 1 % in 0.5 min and equilibration at 1% solvent B during 3 min until the end of the run at 24 min. On the other hand, the gradient for bacterial extracts was carried out by increasing the proportion of solvent B, from 10% to 36% during 4.5 min; 36% to 100% during 4 min, followed by a 2 min isocratic phase with 100% solvent B; back from 100% to 10% in 0.5 min and equilibration at 10% solvent B during 3 min until the end of the run at 14 min.

Mass analyses were made in positive mode, with the nebulization gas (Nitrogen) at a flow of 10 L/min and 40 psg pressure. The capillary tension was 3000 V and gave ionisation energy of 100 eV. Mass spectra were recorded from m/z 50 to 1200. Complementary tandem mass spectrometry analyses (MS/MS) were performed thanks to a collision induced dissociation (CID) with a collision energy of 20 eV. Analyses included QC and blank samples every 10 sample runs. All chromatograms were explored with Mass Hunter Qualitative Analysis B.07.00 software (Agilent Technologies).

Data processing and statistical analysis of wheat and *Pseudomonas* secondary metabolites.

Metabolomic analysis workflow was focused on small molecules (<1000 Da) for both wheat roots and *Pseudomonas* secondary metabolites. LCMS raw files were converted to mzXML format using MS convert "ProteoWizard 2.1" with filtering of m/z and eliminating those that are outside the range of [50 - 450] seconds for *Pseudomonas* culture extracts and [80 - 880] seconds for wheat roots extracts (Kessner *et al.* 2008). The data were then processed using both R software and the collaborative Galaxy platform "Workflow4metabolomics" version 3.3

(Giacomoni *et al.*, 2014). Then the overall workflow of data processing consisted as follows: (1) peak extraction (xcms R package) (Smith *et al.* 2006); (2) peak alignment (xcms R package 3.6.1); (3) elimination of ions also found in blank samples; (4) elimination of ions having a coefficient of variation (CV) of signal intensity higher than 25% in QC pool sample; (5) elimination of the isotopic ions or adducts that represent the same molecule (CAMERA R-package and manual control validation) (Kuhl *et al.* 2012). (6) Then, a last step of normalization was performed according to the total chromatogram intensity given relative intensity for each pre-processed ion. Data processing parameters are presented in **supplementary data table S2** for both wheat and *Pseudomonas* samples. Statistical analyses were realized using R logiciel 3.5.1©2018 software version. Principal component analyses were made with R package Ade4 (Thioulouse and Chessel 1997; Chessel *et al.*, 2004). No-parametric univariate statistical analysis was made using no parametric rank sum statistical test corrected for false discovery (P-Value ≤ 0.05).

Molecular network analysis and metabolites identification

Wheat secondary metabolites identification was carried out using a molecular networking (MN) approach. MN was realized from MS/MS data after wheat root extract analyses according to the protocol described by Olivon and collaborator in 2019. MS/MS data converted to .mzXML format using MS convert "ProteoWizard 2.1" and were processed using MZmine 2 v2.53. All parameters were presented in supplementary data (**Table S3**). Molecular networking was realized thanks to Metgem software with cosine score = 0.6 (Olivon *et al.* 2018). Then wheat secondary metabolites were annotated thanks to MN clustering, MS/MS fragmentation, UV spectrum and comparison to retention time of standards (**Table S4**). *Pseudomonas* secondary metabolites were annotated according to same protocol as developed in Rieusset *et al.* 2020

Acknowledgments

Laura Rieusset was supported by a Ph.D. fellowship from the French Ministère de l'Education Nationale, de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche. We acknowledge the Microbial Ecology laboratory platforms, iBio (in particular D. Abrouk) and CESN ("Centre d'Etude des Substances Naturelles"). We thank J. Le Gouis and the CRB 'Céréales à Paille' for providing seeds of the 3 wheat cultivars. The authors declare that they have no conflict of interest.

References

- Abdelmohsen, U.R., Grkovic, T., Balasubramanian, S., Kamel, M.S., Quinn, R.J., & Hentschel, U. 2015. Elicitation of secondary metabolism in actinomycetes. *Biotechnology Advances* **33**: 798–811.
- Almario J, Bruto M, Vacheron J., Prigent-Combaret C., Moëgne-Loccoz Y & Muller D. 2017. Distribution of 2,4-diacetylphloroglucinol biosynthetic genes among the *Pseudomonas* spp. Reveals unexpected Polyphyletism. *Frontier in Microbiology* **8**: 1–9.
- Almario J, Prigent-Combaret C, Muller D & Moëgne-Loccoz Y. 2013. Effect of clay mineralogy on iron bioavailability and rhizosphere transcription of 2,4-diacetylphloroglucinol biosynthetic genes in biocontrol *pseudomonas protegens*. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, **26**: 566–574.
- Hay A-E, Boubakri H, Buonomo A, Rey M, Meiffren G, Cotin-Galvan L, Comte G, Herrera-Belaroussi A. 2017. Control of endophytic *Frankia* sporulation by *Alnus* nodule metabolites. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **30**: 205–214.
- Audenaert K, Pattery T, Cornelis P, & Höfte M. 2002. Induction of Systemic Resistance to *Botrytis cinerea* in Tomato by *Pseudomonas aeruginosa* 7NSK2: Role of Salicylic Acid, Pyochelin, and Pyocyanin. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **15**: 1147–1156.
- Bais HP, Weir TL, Perry LG, Gilroy S, & Vivanco, JM. 2006. The role of root exudates in rhizosphere interactions with plants and other organisms. *Annual Review of Plant Biology* **57**: 233–266.
- Batyrshina ZS, Yaakov B, Shavit R, Singh A, & Tzin V. 2020. Comparative transcriptomic and metabolic analysis of wild and domesticated wheat genotypes reveals differences in chemical and physical defense responses against aphids. *BMC Plant Biology*, **20**: 1–20.
- Bertani G, 1951 Studies on lysogenesis I. *Journal of Bacteriology* **62**: 293–300.
- Beset-Manzoni Y, Rieusset L, Joly P, Comte G, and Prigent-Combaret C. 2018. Exploiting rhizosphere microbial cooperation for developing sustainable agriculture strategies. *Environmental Science and Pollution Research* **25**:1–18.
- Bhattacharya A, Sood P, & Citovsky V. 2010. The roles of plant phenolics in defence and communication during *Agrobacterium* and *Rhizobium* infection. *Molecular Plant Pathology*, **11**: 705–719.
- Bouffaud M L, Poirier M A, Muller D, & Moëgne-Loccoz Y. 2014. Root microbiome relates to plant host evolution in maize and other *Poaceae*. *Environmental Microbiology*, **16**: 2804–2814.
- Brazelton J N, Pfeufer E E, Sweat T A, Gardener B B M, & Coenen C. 2008. 2,4-Diacetylphloroglucinol Alters Plant Root Development. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, **21**: 1349–1358.
- Brink SC. 2016 Unlocking the secrets of the rhizosphere. *Trends in plant science*. **21**: 169-170.
- Budzikiewicz, H., Lange, E. and Ockels, W. 1981. The mass spectral fragmentation behavior of pyridine carboxylic and thiocarboxylic acid esters. *Phosphorus and Sulfur and the Related Elements* **11**: 33–45.
- Budzikiewicz, H. 2003. Heteroaromatic monothiocarboxylic acids from *Pseudomonas* spp. *Biodegradation* **14**: 65–72

- Bulgarelli D, Garrido-Oter R, Münch P C, Weiman A, Dröge J, Pan Y, McHardy A C & Schulze-Lefert P. 2015. Structure and function of the bacterial root microbiota in wild and domesticated barley. *Cell Host & Microbe*, **17**: 392–403.
- Chagas F O, Pessotti R D C, Caraballo-Rodríguez A M, & Pupo M T. 2018. Chemical signaling involved in plant-microbe interactions. *Chemical Society Reviews*, **47**: 1652–1704.
- Chamam A, Wisniewski-Dyé F, Comte G, Bertrand C, & Prigent-Combaret C. 2015. Differential responses of *Oryza sativa* secondary metabolism to biotic interactions with cooperative, commensal and phytopathogenic bacteria. *Planta*, **242**: 1439–1452.
- Chessel, D., Dufour, A.B., and Thioulouse, J. (2004). The ade4 package - I: One-table methods. *R News* **4**: 5–10.
- Chin-A-Woeng T F C, Bloemberg G V, & Lugtenberg B J J. 2003. Phenazines and their role in biocontrol by *Pseudomonas* bacteria. *New Phytologist*, **157**: 503–523
- Combes-Meynet E, Pothier J F, Moëgne-Loccoz Y, & Prigent-Combaret C. 2011. The *Pseudomonas* secondary metabolite 2,4-diacetylphloroglucinol is a signal inducing rhizoplane expression of *Azospirillum* genes involved in plant-growth promotion. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, **24**: 271–284.
- Cornelis P. 2020. Putting an end to the *Pseudomonas aeruginosa* IQS controversy. *MicrobiologyOpen*, **9**: 2019–2020.
- Cortese MS, Paszczynski A, Lewis TA, Sebat JL, Borek V, and Crawford RL. 2002. Metal chelating properties of pyridine-2,6-bis(thiocarboxylic acid) produced by *Pseudomonas* spp. and the biological activities of the formed complexes. *BioMetals* **15**: 103–120.
- Cotton T E A, Pétriacq P, Cameron D D, Meselmani M AI, Schwarzenbacher R, Rolfe S A, & Ton J. 2019. Metabolic regulation of the maize rhizobiome by benzoxazinoids. *ISME Journal*, **13**: 1647–1658.
- Couillerot O, Combes-Meynet E, Pothier J F, Bellvert F, Challita E, Poirier M A, Prigent-Combaret C. 2011. The role of the antimicrobial compound 2,4-diacetylphloroglucinol in the impact of biocontrol *Pseudomonas fluorescens* F113 on *Azospirillum brasilense* phytostimulators. *Microbiology*, **157**: 1694–1705.
- de Werra P, Huser A, Tabacchi R, Keel C, & Maurhofer M. 2011. Plant-and microbe-derived compounds affect the expression of genes encoding antifungal compounds in a pseudomonad with biocontrol activity. *Applied and Environmental Microbiology*, **77**: 2807–2812.
- Dinelli G, Segura-Carretero A, Di Silvestro R, Marotti I, Arráez-Román D, Benedettelli S, Fernandez-Gutierrez A. 2011. Profiles of phenolic compounds in modern and old common wheat varieties determined by liquid chromatography coupled with time-of-flight mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, **1218**: 7670–7681.
- Elias S, & Banin E. 2012. Multi-species biofilms: Living with friendly neighbors. *FEMS Microbiology Reviews*, **36**: 990–1004.
- El Zemrany H, Cortet J, Lutz MP, Chabert A, Baudouin E, Haurat J, Maughan N, Felix D, Défago G, Bally R. 2006 Field survival of the phytostimulatory *Azospirillum lipoferum* CRT1 and functional impact on

- maize crop, biodegradation of crop residues, and soil faunal indicators in a context of decreasing nitrogen fertilisation. *Soil Biology and Biochemistry* **38**: 1712–1727.
- Flemming H-C, Wingender J, Szewzyk U, Steinberg P, Rice S A, & Kjelleberg S. 2016. Biofilms: an emergent form of bacterial life. *Nature Reviews Microbiology*, **14**: 563–575.
- Giacomoni F, Le Corguillé G, Monsoor M, Landi M, Pericard P, Pétéra M, Caron C. 2015 Workflow4Metabolomics: A collaborative research infrastructure for computational metabolomics. *Bioinformatics* **31**: 1493–1495.
- Glauser G, Marti G, Villard N, Doyen G A, Wolfender J L, Turlings T C J, & Erb M. 2011 Induction and detoxification of maize 1,4-benzoxazin-3-ones by insect herbivores. *Plant Journal*, **68**: 901–911.
- González J F & Venturi V. 2013. A novel widespread interkingdom signaling circuit. *Trends in Plant Science*, **18**: 167–174.
- Grandclément C, Tannières M, Moréra S, Dessaux Y & Faure D. 2015. Quorum quenching: Role in nature and applied developments. *FEMS Microbiology Reviews*, **40**: 86–116.
- Gross H & Loper J E. 2009. Genomics of secondary metabolite production by *Pseudomonas spp* **0**: 1408–1446.
- Haas D & Keel C. 2003. Regulation of antibiotic production in root-colonizing *Pseudomonas spp.* and relevance for biological control of plant disease. *Annual Review of Phytopathology*, **41**: 117–153.
- Hartmann A, Schmid M, van Tuinen D & Berg G. 2009. Plant-driven selection of microbes. *Plant and Soil*, **321**: 235–257.
- Häusler R E, Ludewig F & Krueger S 2014. Amino acids - A life between metabolism and signaling. *Plant Science*, **229**: 225–237.
- Hildebrand, U. and Budzikiewicz, H. (1986) (+)-3,4-Dihydro-5-methyl-4-n-alkyl- und alkenyl-2H-pyrrole aus *Pseudomonas putida*. *Z. Naturforsch* **41**: 1161-1169.
- Hu L, Robert C A M, Cadot S, Zhang X, Ye M, Li B, Erb M. 2018. Root exudate metabolites drive plant-soil feedbacks on growth and defense by shaping the rhizosphere microbiota. *Nature Communications* **9**: 1–13.
- Huang A C, Jiang T, Liu Y X, Bai Y C, Reed J, Qu B, Osbourn A. 2019. A specialized metabolic network selectively modulates *Arabidopsis* root microbiota. *Science*, **364**: 6440.
- Jousset A, Rochat L, Lanoue A, Bonkowski M, Keel C & Scheu S. 2011. Plants respond to pathogen infection by enhancing the antifungal gene expression of root-associated bacteria. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, **24**: 352–358.
- Keller L & Surette M G. 2006. Communication in bacteria: An ecological and evolutionary perspective. *Nature Reviews Microbiology*, **4**: 249–258.
- Kessner D, Chambers M, Burke R, Agus D and Mallick P. 2008 ProteoWizard: Open source software for rapid proteomics tools development. *Bioinformatics* **24**: 2534–2536.

- King E O, Ward M K and Raney D E. 1954 Two simple media for the demonstration of pyocyanin and fluorescein. *Journal of Laboratory and Clinical Medicine* **44**: 301-307.
- Kuhl C, Tautenhahn R, Böttcher C, Larson T R and Neumann S. 2012 CAMERA: An integrated strategy for compound spectra extraction and annotation of liquid chromatography/mass spectrometry data sets. *Analytical Chemistry* **84**: 283–289.
- Lee J, Wu J, Deng Y, Wang J, Wang C, Wang J, Zhang L H. 2013. A cell-cell communication signal integrates quorum sensing and stress response. *Nature Chemical Biology*, **9**: 339–343.
- Lim C K, Penesyan A, Hassan K A, Loper J E & Paulsen I T. 2013. Effect of tannic acid on the transcriptome of the soil bacterium *Pseudomonas protegens* Pf-5. *Applied and Environmental Microbiology*, **79**: 3141–3145.
- Macoy D M, Kim W Y, Lee S Y & Kim M G. 2015. Biosynthesis, physiology, and functions of hydroxycinnamic acid amides in plants. *Plant Biotechnology Reports*, **9**: 269–278.
- Maddula V S R K, Pierson E A & Pierson L S. 2008. Altering the ratio of phenazines in *Pseudomonas chlororaphis* (*aureofaciens*) strain 30-84: Effects on biofilm formation and pathogen inhibition. *Journal of Bacteriology*, **190**: 2759–2766.
- Mark G L, Dow J M, Kiely P D, Higgins H, Haynes J, Baysse C, O’Gara F. 2005. Transcriptome profiling of bacterial responses to root exudates identifies genes involved in microbe-plant interactions. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **102**: 17454–17459.
- Marti G, Erb M, Boccard J, Glauser G, Doyen G R, Villard N, Wolfender J L. 2013. Metabolomics reveals herbivore-induced metabolites of resistance and susceptibility in maize leaves and roots. *Plant, Cell and Environment*, **36**: 621–639
- Mathesius U, Mulders S, Gao M, Teplitski M, Caetano-Anolles G, Rolfe B G & Bauer W D. 2003. Extensive and specific responses of a eukaryote to bacterial quorum-sensing signals. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **100**: 1444–1449.
- Mavrodi D V, Blankenfeldt W & Thomashow L S. 2006. Phenazine Compounds in Fluorescent *Pseudomonas* Spp. Biosynthesis and Regulation *Annu. Rev. Phytopathol*, **44**: 417–445.
- Mazzola M, Cook R J, Thomashow L S, Weller D M & Pierson L S. 1992. Contribution of phenazine antibiotic biosynthesis to the ecological competence of fluorescent pseudomonads in soil habitats. *Applied and Environmental Microbiology*, **58**: 2616–2624.
- Meyer T, Renoud S, Vigouroux A, Miomandre A, Gaillard V, Kerzaon I, Lavire C. 2018. Regulation of hydroxycinnamic acid degradation drives *Agrobacterium fabrum* lifestyles. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, **31**: 814–822.
- Morohoshi, T., Yamaguchi, T., Xie, X., Wang, W., Takeuchi, K., and Someya, N. 2017. Complete Genome Sequence of *Pseudomonas chlororaphis* subsp. *Aurantiaca* reveals a triplicate quorum-sensing mechanism for regulation of phenazine production. *Microbes and environment* **32**: 47–53.
- Neal A L, Ahmad S, Gordon-Weeks R & Ton J. 2012. Benzoxazinoids in root exudates of maize attract *Pseudomonas putida* to the rhizosphere. *PLoS ONE*, 7(4).

- Niemeyer H M. 2009. Hydroxamic acids derived from 2-hydroxy-2h-1,4-benzoxazin-3(4h)-one: Key defense chemicals of cereals. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **57**: 1677–1695.
- Olivon, F., Elie, N., Grelier, G., Roussi, F., Litaudon, M., & Touboul, D. 2018. MetGem Software for the Generation of Molecular Networks Based on the t-SNE Algorithm. *Analytical Chemistry*, **90**: 13900–13908.
- Olivon F, Remy S, Grelier G, Apel C, Eydox C, Guillemot J C, Litaudon M. 2019. Antiviral compounds from *Codiaeum peltatum* targeted by a multi-informative molecular networks approach. *Journal of Natural Products*, **82**: 330–340.
- Pérez-Montaña F, Guasch-Vidal B, González-Barroso S, López-Baena F J, Cubo T, Ollero F J, Espuny, M R 2011. Nodulation-gene-inducing flavonoids increase overall production of autoinducers and expression of N-acyl homoserine lactone synthesis genes in rhizobia. *Research in Microbiology*, **162**: 715–723.
- Price-Whelan A, Dietrich L E P & Newman D K. 2006. Rethinking “secondary” metabolism: physiological roles for phenazine antibiotics. *Nature Chemical Biology*, **2**: 71–78.
- Raaijmakers J M & Mazzola M. 2012. Diversity and natural functions of antibiotics produced by beneficial and plant pathogenic bacteria. *Annual Review of Phytopathology*, **50**: 403–424.
- Redondo-Nieto M, Barret M, Morrissey J, Germaine K, Martínez-Granero F, Barahona E, Rivilla R. 2013. Genome sequence reveals that *Pseudomonas fluorescens* F113 possesses a large and diverse array of systems for rhizosphere function and host interaction. *BMC Genomics*, **14**: 1–17.
- Rieusset L, Rey M, Muller D, Vacheron J, Gerin F, Dubost A, Comte G, Prigent-Combaret C. 2020. Secondary metabolites from plant-associated *Pseudomonas* are overproduced in biofilm. *Microbial Biotechnology*, 2020.
- Rochat L, Péchy-Tarr M, Baehler E, Maurhofer M & Keel C. 2010. Combination of fluorescent reporters for simultaneous monitoring of root colonization and antifungal gene expression by a biocontrol pseudomonad on cereals with flow cytometry. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, **23**: 949–961.
- Rozier, C., Erban, A., Hamzaoui, J., Prigent-Combaret, C. Comte, G ... and Legendre L. 2016. Xylem sap metabolite profile changes during phytostimulation of maize by the plant growth-promoting rhizobacterium, *Azospirillum lipoferum* CRT1. *Metabolomics* 6: 2153–0769.
- Sasse J, Martinoia E & Northen T. 2018. Feed Your Friends: Do Plant Exudates Shape the Root Microbiome? *Trends in Plant Science*, **23**: 25–41.
- Selin, C., Habibian, R., Poritsanos, N., Athukorala, S.N.P., Fernando, D., and De Kievit, T.R. 2010. Phenazines are not essential for *Pseudomonas chlororaphis* PA23 biocontrol of *Sclerotinia sclerotiorum* but do play a role in biofilm formation. *FEMS Microbiology Ecology* **71**: 73–83
- Shanahan P, Sullivan D J O, Simpson P & Jeremy D 1992. Production Isolation of 2, 4-Diacetylphloroglucinol from a Fluorescent Pseudomonad and Investigation of Physiological Parameters Influencing Its Production. *Applied and Environmental Microbiology*, **58**: 0–5.

- Smith CA, Want E J, Maille GO, Abagyan R and Siuzdak G. 2006 XCMS: processing mass spectrometry data for metabolite profiling using nonlinear peak alignment, matching, and identification. *Analytical Chemistry* **78**: 779–787
- Spaepen S, Vanderleyden J & Remans R. 2007. Indole-3-acetic acid in microbial and microorganism-plant signaling. *FEMS Microbiology Reviews*, **31**: 425–448.
- Stringlis I A, Yu K, Feussner K, De Jonge R, Van Bentum S, Van Verk M C, Pieterse C M J. 2018. MYB72-dependent coumarin exudation shapes root microbiome assembly to promote plant health. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **115**.
- Subramoni S, Gonzalez J F, Johnson A, Péchy-Tarr M, Rochat L, Paulsen I, Venturi, V. 2011. Bacterial subfamily of LuxR regulators that respond to plant compounds. *Applied and Environmental Microbiology*, **77**: 4579–4588.
- Thioulouse, J., and Chessel, D. (1997) ADE-4: multivariate analysis and graphical display software. *Stat Comput* **7**: 75–83.
- Vacheron J, Desbrosses G, Bouffaud M L, Touraine B, Moëgne-Loccoz Y, Muller D, Prigent-Combaret, C. 2013. Plant growth-promoting rhizobacteria and root system functioning. *Frontiers in Plant Science*, **4**: 356.
- Vacheron J, Moëgne-Loccoz Y, Dubost A, Gonçalves-Martins M, Muller D & Prigent-Combaret C. 2016. Fluorescent *pseudomonas* strains with only few plant-beneficial properties are favoured in the maize rhizosphere. *Frontiers in Plant Science*, **7**: 1–13.
- Valente J, Gerin F, Le Gouis J, Moëgne-Loccoz Y & Prigent-Combaret C. 2020. Ancient wheat varieties have a higher ability to interact with plant growth-promoting rhizobacteria. *Plant Cell and Environment*, **43**: 246–260.
- Valette M, Rey M, Gerin F, Comte G & Wisniewski-Dyé F 2020. A common metabolomic signature is observed upon inoculation of rice roots with various rhizobacteria. *Journal of Integrative Plant Biology*, **62** 228-246
- Venturi V & Keel C. 2016. Signaling in the Rhizosphere. *Trends in Plant Science*, **21**: 187–198.
- Voges M, Bai Y, Schulze-Lefert P & Sattely E S. 2019. Plant-derived coumarins shape the composition of an *Arabidopsis* synthetic root microbiome. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **116**: 12558–12565.
- Wang D, Yu J M, Dorosky R J, Pierson L S & Pierson E A. 2016. The phenazine 2-hydroxy-phenazine-1-carboxylic acid promotes extracellular DNA release and has broad transcriptomic consequences in *Pseudomonas chlororaphis* 30-84. *PLoS ONE*, **11**: 1–22.
- Waters C M & Bassler B L 2005. Quorum Sensing: Communication in Bacteria. *Annual Reviews in Cell Development Biology*, **21**: 319–346.
- Watrous J, Roach P, Alexandrov T, Heath B S, Yang J Y, Kersten R D, Dorrestein P C. 2012. Mass spectral molecular networking of living microbial colonies. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **109**: E1743-52.

- Weller, D M. 2007. *Pseudomonas* biocontrol agents of soilborne pathogens: Looking back over 30 years. *Phytopathology*, **97**: 250–256.
- Wu H, Haig T, Pratley J, Lemerle D & An M. 2001. Allelochemicals in wheat (*Triticum aestivum* L.): Cultivar difference in the exudation of phenolic acids. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **49**: 3742–3745.
- Ye L, Cornelis P, Guillemyn K, Ballet S & Hammerich O. 2014. Structure revision of N-mercapto-4-formylcarbostyryl produced by *Pseudomonas fluorescens* G308 to 2-(2-hydroxyphenyl)thiazole-4-carbaldehyde [aeruginaldehyde]. *Natural Product Communications*, **9**: 789–794.
- Youard Z A, Mislin G L A, Majcherczyk P A, Schalk I J & Reimann C. 2007. *Pseudomonas fluorescens* CHA0 produces enantio-pyochelin, the optical antipode of the *Pseudomonas aeruginosa* siderophore pyochelin. *Journal of Biological Chemistry*, **282**: 35546–35553.
- Yu J M, Wang D, Pierson LS & Pierson E A. 2018. Effect of producing different phenazines on bacterial fitness and biological control in *Pseudomonas chlororaphis* 30-84. *Plant Pathology Journal*, **34**: 44–58.
- Zawadzka, A.M., Crawford, R.L., and Paszczyński, A.J. 2006 Pyridine-2,6- bis(thiocarboxylic acid) produced by *Pseudomonas stutzeri* KC reduces and precipitates selenium and tellurium oxyanions. *Applied and Environmental Microbiology* **72**: 3119 –3129

Supplementary data

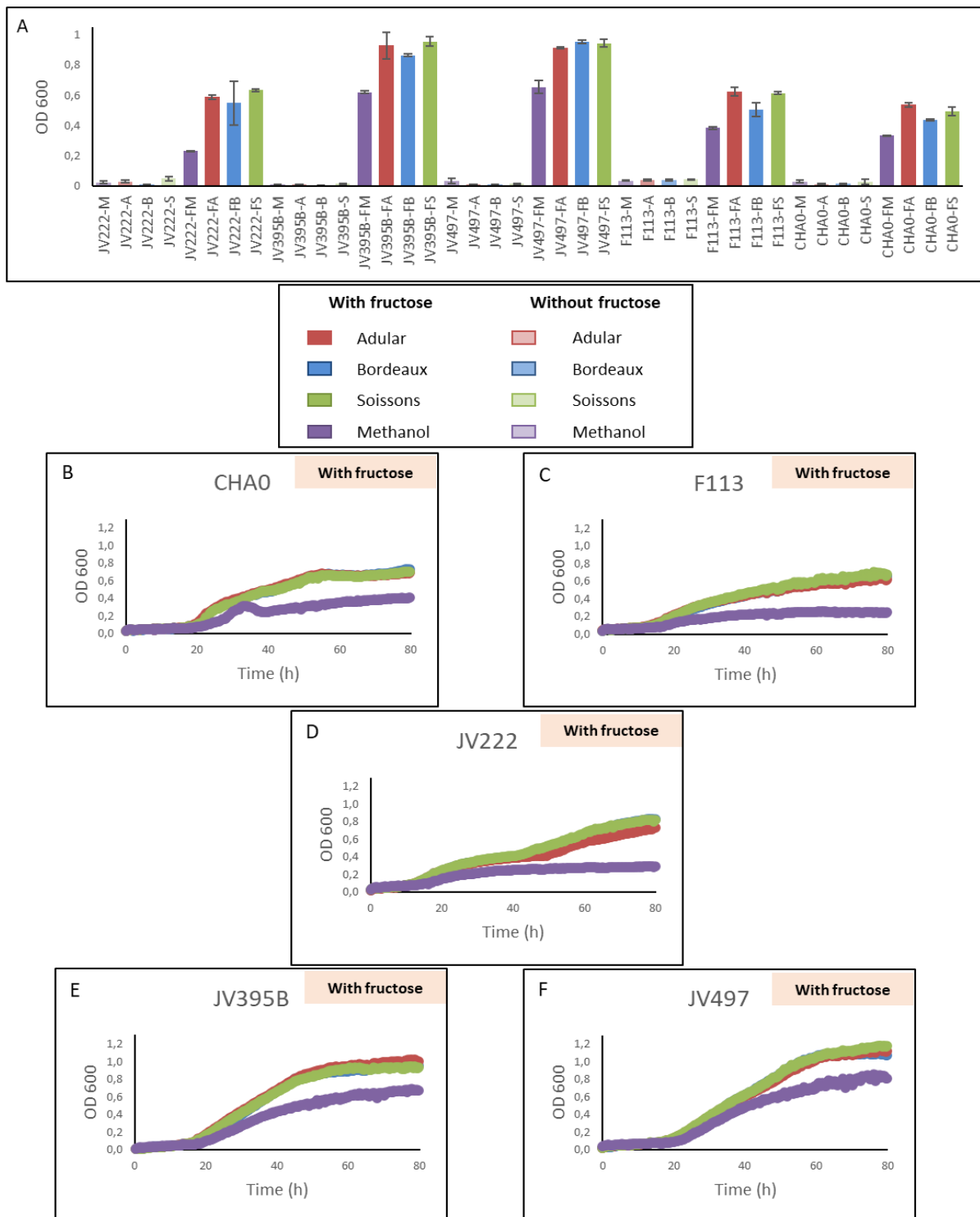


Figure S1: Effect of wheat root extracts ($c = 50 \mu\text{g/mL}$) on the growth of *Pseudomonas* strains in minimum medium (MM) with or without fructose after 3 days (A). Growth curves of *Pseudomonas protegens* CHA0 (B) *Pseudomonas kilonensis* F113 (C), *Pseudomonas koreensis* JV222 (D), *Pseudomonas chlororaphis* JV395B (E) and JV497 (F) in MM fructose complemented with wheat extracts from genotype Adular, Bordeaux and Soissons at $50 \mu\text{g/mL}$.

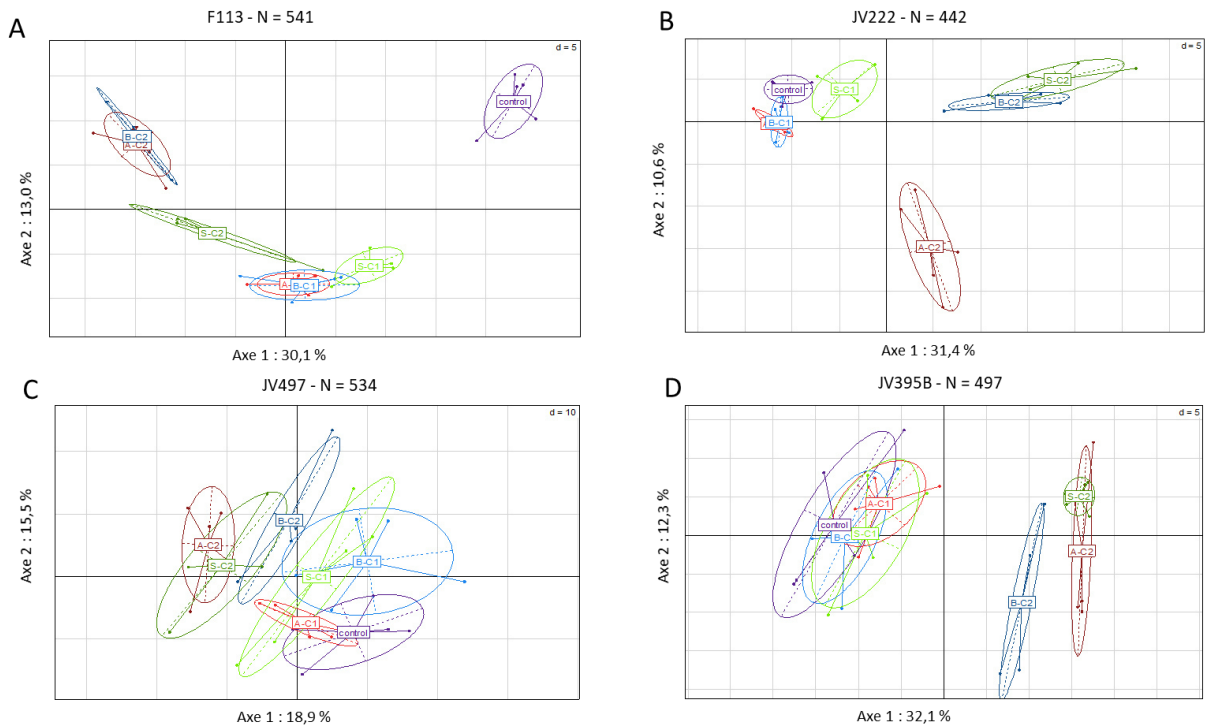


Figure S2: Principal component analysis obtained from LC–HRMS profiles of *Pseudomonas kilonensis* F113 (A), *Pseudomonas korensis* JV222 (B), *Pseudomonas chlororaphis* JV497 (C) and JV395B (D) cultivated in MMF medium complemented with wheat root extract from Adular (A), Soissons (S), or Bordeaux (B) at 25 mg/mL (C1) and 50 µg/mL (C2) after 6 days incubation.

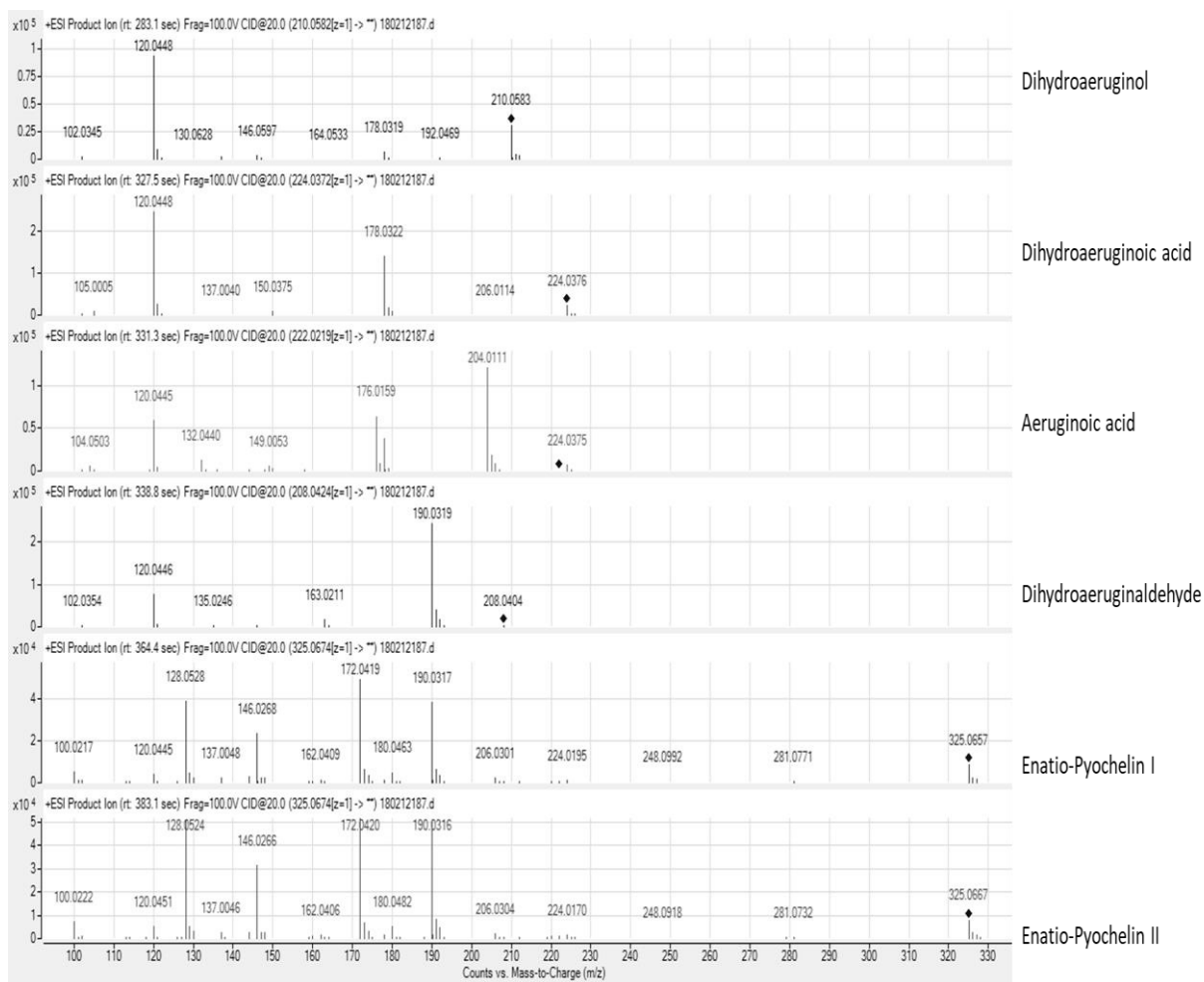


Figure S3: Enantio-pyochelein I and II, aeruginic acid, dihydroaeruginic acid, dihydroaeruginol and dihydroaeruginaldehyde MS/MS fragmentation

Table S1. Chemical characterization of annotated secondary metabolites combined with statistically significant differences between genotypes

N°	rt (min)	[M+H]	UV ^λ (nm)	Formula	MSMS - fragmentation	Neutral loss	Putative annotation	A*	B*	S*
AMINO ACIDS AND DERIVATIVES										
1	0.96	130.0861	-	C ₆ H ₁₁ NO ₂	-	-	Methyl proline	-	-	-
2	1.58	182.0568	275	C ₉ H ₁₁ NO ₃	136.0766; 123.0430; 119.0447	-	Tyrosine	a	a	a
3	4.83	205.0974	218; 278	C ₁₁ H ₁₂ N ₂ O ₂	146.0611; 132.0809; 118.0667	-	Tryptophan	a	a	a
4	3.29	166.05	-	C ₉ H ₁₁ NO ₂	120.0809; 103.0538; 84.9605	-	Phenylalanine	a	a	a
BENZOXAZINOIDS										
5	3.88	344.0957; 366.0786 [M+Na]	264; 286	C ₁₄ H ₁₇ NO ₉	182.0439; 164.0333; 136.0383	162	DHBOA-Glc	b	c	a
6	4.09	344.0952; 366.0786 [M+Na]	264; 288	C ₁₄ H ₁₇ NO ₉	182.0437; 164.0333; 136.0412	162	DIBOA-Glc	ab	b	a
7	5.96	328.1006; 350.0835 [M+Na]	254; 280	C ₁₄ H ₁₇ NO ₈	166.0484; 148.0358; 120.0424	162	HBOA-Glc	c	b	a
8	6.03	344.0960; 366.0787 [M+Na]	255; 282	C ₁₄ H ₁₇ NO ₉	182.0450; 164.0314; 136.0351	162	BX4	c	b	a
9	6.20	374.1062 396.0907 [M+Na]	265; 287	C ₁₅ H ₁₉ NO ₁₀	212.0550; 194.0444; 166.0488	162	BX5	b	b	a
10	6.39	558 [M+Na]	267; 290	C ₂₁ H ₂₉ NO ₁₅	212.0550; 194.0444; 166.0488	162 X 2	DIMBOA-Glc-Glc	a	a	a
11	6.96	358.1164; 380.0977 [M+Na]	263; 286	C ₁₅ H ₁₉ NO ₉	196.0610; 178.0506; 150.0523	162	HMBOA-Glc	c	b	a
12	7.17	374.1056; 396.0884 [M+Na]	265; 292	C ₁₅ H ₁₉ NO ₁₀	212.0537; 194.0531; 166.0483	162	DIMBOA-Glc	a	a	a
13	7.61	212.0556	265; 290	C ₉ H ₉ NO ₅	194.0439; 166.0479; 110.0599; 95.0464	-	DIMBOA	a	a	a
14	7.72	226.0697	265; 290	C ₁₀ H ₁₁ NO ₅	166.0479; 138.0530; 110.0596	-	BX10	b	a	a
15	8.05	358.1154 380.0974 [M+Na]	280	C ₁₅ H ₁₉ NO ₉	196.0610; 178.0506;	162	BX11	a	b	a
16	9.18	388.1222; 410.1042 [M+Na]	264; 294	C ₁₆ H ₂₁ NO ₁₀	226.0703; 208.0588; 194.0433; 166.0484	162	HDMBOA-Glc	b	a	a
17	9.33	166.0489	231; 287	C ₈ H ₇ NO ₃	110.0596; 95.0466	-	MBOA	a	a	a
FLAVONOIDS										
18	8.12	565.1571	223; 270; 333	nd	nd	nd	Schaftoside /isoschaftoside	b	a	b
19	8.52	565.1567	223; 270; 333	nd	nd	nd	Schaftoside /isoschaftoside	b	a	c
20	9.30	565.1574	223; 270; 333	nd	nd	nd	Schaftoside /isoschaftoside	b	a	b
HYDROXYCINNAMIC ACIDS AND HYDROXYCINNAMIC ACID AMIDES DERIVATIVES										
21	4.03	235.1444	nd	C ₁₃ H ₁₈ N ₂ O ₂	176.07; 147.0437; 119.0509	88	Coumaroyl-putrescine	a	a	a
22	4.12	251.1386	nd	nd	174.0535; 147.0449; 119.0506	104	Coumaroyl derivative	a	a	a

23	4.40	251.1407	270 ; 295	nd	174.0535 ; 147.0449 ; 119.0506	104	Coumaroyl derivative	a	a	b
24	4.93	235.1448	300	C ₁₃ H ₁₈ N ₂ O ₂	176.07 ; 147.0437 ; 119.0509	88	Coumaroyl- putrescine	a	a	b
25	4.28	293.1615	288; 304	Nd	164.0662; 147.0439	146	Coumaroyl derivative	b	a	a
26	4.39	291.1451	290; 310	nd	255.1237; 147.0442; 127.0973	144	Coumaroyl derivative	c	b	a
27	5.02	281.1511	280; 308	nd	225.0751; 177.0537; 145.0286	104	Feruloyl derivative	b	a	c
28	5.04	323.1724	290; 323	nd	247.1205; 177.0524; 145.0258	146	Feruloyl derivative	c	b	a
29	5.26	293.1615	288; 304	nd	164.0662; 147.0439	146	Coumaroyl derivative	b	a	a
30	5.26	277.1648	265; 295	C ₁₄ H ₂₀ N ₄ O ₂	218.1206 ; 147.0436 ; 119.0503	130	Coumaroyl- agmatine	a	a	a
31	5.36	291.1451	290; 310	nd	255.1237; 147.0442; 127.0973	144	Coumaroyl derivative	b	b	a
32	5.73	265.1523	290; 320	C ₁₄ H ₂₀ N ₂ O ₃	225.1061; 177.0535; 145.0264; 117.0312	88	Feruloyl-putrescine	a	a	b
33	5.92	249.1581	nd	C ₁₄ H ₂₀ N ₂ O ₂	175.0803; 147.0436; 119.0504	102	Coumaroyl- cadaverine	a	b	c
34	6.03	323.1724	290; 323	nd	247.1205; 177.0524; 145.0258	146	Feruloyl derivative	b	a	a
35	6.07	369.1181	nd	C ₁₇ H ₂₀ O ₉	177.0521; 149.0514; 145.0249	192	Feruloyl-quinic	a	b	b
36	6.27	337.1885	nd	C ₁₆ H ₂₄ N ₄ O ₄	207.0641; 175.0375; 147.0463	130	Sinapoyl- agmatine	a	b	a
37	6.32	277.1648	265; 295	C ₁₄ H ₂₀ N ₄ O ₂	218.1206 ; 147.0436 ; 119.0503	130	Coumaroyl- agmatine	a	a	a
38	6.71	279.1693	nd	C ₁₅ H ₂₂ N ₂ O ₃	262.0273; 177.0528; 145.0284	102	Feruloyl- cadaverine	a	b	c
39	7.59	337.1858	nd	C ₁₆ H ₂₄ N ₄ O ₄	207.0641; 175.0375; 147.0463	130	Sinapoyl- agmatine	a	a	a
40	11.89	557.1687	297; 328	nd	177.0541; 169.0462; 145.0268	nd	Feruloyl derivative	a	b	a
41	11.26	515.1603	240; 295; 328	nd	177.0557	nd	Feruloyl derivative	a	b	a
42	11.49	445.1483	295; 325	nd	177.0545 ; 145.0282	nd	Feruloyl derivative	a	a	a
43	11.84	343.1106	288; 328	nd	187.0384 ; 173.0720 ; 157.0896 ; 131.0469	nd	Cinamoyl derivative	a	a	a
CLUSTER N°1										
44	3.38	452.1778	225; 278	nd	193.0611; 177.0544; 141.0565	nd	nd	a	b	b
45	6.78	420.1854	257; 300	nd	193.0475; 163.0600; 145.0508	nd	nd	a	b	b
46	9.94	438.2353	-	nd	223.0574 ; 145.0491; 127.0412	nd	nd	a	b	a
47	10.36	440.2503	257; 282; 318	nd	223.0594; 193.0516; 163.0600; 145.0493	nd	nd	a	b	b
CLUSTER N°2										
48	2.98	221.1294	-	Nd	176.0720; 148.06673; 130.0639	nd	nd	b	a	b

49	3.83	237.1238	-	Nd	176.0705; 148.0759; 130.0650	nd	nd	c	a	b
50	4.05	205.1328	-	Nd	160.0744; 142.0602; 132.0816	nd	nd	a	a	a
CLUSTER N°3										
51	2.85	247.1295	-	Nd	184.0978; 130.0474; 84.0429; 72.0820	nd	nd	b	a	c
52	4.69	261.1428	-	nd	246.0746; 84.0457	nd	nd	b	a	c
53	5.03	261.1434	-	nd	198.1123; 132.1024; 86.0986	nd	nd	b	a	c

* Statistically significant differences between genotype (non-parametric test corrected for false discovery p value ≤ 0.05) were represented by letter a,b and c.

Table S2. Parameter settings used for metabolomics data processing

Step	Method	Parameters	Values wheat root samples	Values <i>Pseudomonas</i> strains culture samples
Peak detection (Peakpicking)^a	centWave	ppm	10	10
		mzdiff	0.05	0.001
		prefilter	3, 5000	3, 1500
		snthresh	10	10
		peakwidth	4, 15	4, 15
		noise	10000	2000
Peak grouping (group)^a	density	bw	4	2
		mzwid	0.25	0.25
		minfrac	0.2	0.2
FillPeaks	chrom			

^a data processed with xcms R-package on collaborative Galaxy platform "Workflow4metabolomics" version 3.3

Table S3. Molecular networking: MZmine 2 data-preprocessing parameters

Steps	Methods	Parameters	Values
Mass detection		Noise level MS1	0
		Noise level MS2	0
chromatogram builder	ADAP	Minimum group size of scan	4
		Group intensity threshold	3000
		Minimum highest intensity	4000
		m/z tolerance	0.005 (20 ppm)
Deconvolution	ADAP Wavelets algorithm	S/N threshold	8
		Minimum feature height	4000
		Coefficient/area threshold	20
		Peak duration range	0.05 – 1 min
		T _R wavelet range	0.01 – 0.07 min
MS2 scans paired		m/z tolerance	0.02 Da
		t _R tolerance	0.3 min
Isotopologue grouping	Isotopic peak grouper algorithm	m/z tolerance	0.005 (20 ppm)
		t _R tolerance	0.2 min
Filtering	Feature list rows filter	Retention time range	1 – 14 min
		Keep only peaks with MS2 scan	
Peak alignment	Join aligner module	m/z tolerance	0.005 (20 ppm)
		Weight for m/z	2
		t _R tolerance	0.5 min
		Weight for t _R	1
Gap filled		m/z tolerance	0.005 (20 ppm)
		t _R tolerance	0.5 min

Table S4. List of 15 chemical standards used in UHPLC-DAD-qTOF analyses

N°	Name	Molecular formula	Origin	Purity
1	Monoacetylphloroglucinol	C ₈ H ₈ O ₄	Cayman Chemical	≥98%
2	2,4-diacetylphloroglucinol	C ₁₀ H ₁₀ O ₅	Toronto Research Chemicals Inc.	≥98%
3	Pyrrrolnitrin	C ₁₀ H ₆ Cl ₂ N ₂ O ₂	SIGMA Chemical Co.	≥98%
4	Phenazine-1-carboxylic acid	C ₁₃ H ₈ N ₂ O ₂	Toronto Research Chemicals Inc.	≥98%
5	3-OH-C6-HSL	C ₁₀ H ₁₇ NO ₄	SIGMA Chemical Co.	≥98%
6	Dimethyl 2,6-pyridinedicarboxylate	C ₉ H ₉ NO ₄	SIGMA Chemical Co.	≥98%
7	Indole-acetic-acid	C ₁₀ H ₉ NO ₂	SIGMA Chemical Co.	≥98%
8	Tryptophan	C ₁₁ H ₁₂ N ₂ O ₂	SIGMA Chemical Co.	≥98%
9	Phenylalanin	C ₉ H ₁₁ NO ₂	SIGMA Chemical Co.	≥98%
10	Fumarique acid	C ₄ H ₄ O ₄	SIGMA Chemical Co.	≥98%
12	Caffeic acid	C ₉ H ₈ O ₄	SIGMA Chemical Co.	≥98%
13	Succinic acid	C ₄ H ₆ O ₄	SIGMA Chemical Co.	≥98%
14	DIBOA-Glc	C ₁₄ H ₁₇ NO ₉	-	-
15	MBOA	C ₈ H ₇ NO ₃	SIGMA Chemical Co.	≥98%

Partie B : Effet des métabolites
racinaires sur la production de biofilm

Introduction

Précédemment, nous avons observé une production différentielle de métabolites secondaires des souches en mode biofilm par rapport au mode planctonique (**chapitre 2**), ainsi qu'en présence des extraits racinaires de blé (chapitre 3 partie A). Nos analyses métabolomiques ont montré que ces deux paramètres interfèrent fortement avec la production de métabolites secondaires chez les souches de *Pseudomonas* étudiées. Certains métabolites mis en évidence dans ces analyses ont leur production modifiée à la fois en fonction du mode de vie et en présence des extraits racinaires de blé. C'est le cas par exemple des AHLs qui sont parmi les molécules dont la production est la plus impactée par les deux paramètres chez les deux souches de *P. chlororaphis*. Ces molécules sont fortement surproduites en mode biofilm et présence des extraits racinaires de blé. Les AHLs sont des médiateurs du QS et sont capables de réguler de nombreuses fonctions bactériennes (Venturi and Keel 2016). La forte concentration cellulaire et le contact cellule-cellule, caractéristiques du mode biofilm peuvent favoriser la production de ces molécules et les interactions entre les cellules bactériennes (Flemming et al. 2016). Les AHLs sont impliqués dans la régulation de la production de métabolites secondaires, chez les *P. chlororaphis* et notamment dans la régulation de la production de phénazines (Morohoshi et al. 2017). La production de phénazines est également fortement impactée par le mode de vie bactérien et par la présence des extraits racinaires de blé chez les souches étudiées. Les deux paramètres étudiés favorisent particulièrement la production des dérivés de la phénazine-1-carboxylique (PCA) tels que l'OH-PCA et l'OH-PHZ chez JV395B, ou encore la PCN chez JV497 (**Chapitre 3, Figure 4**). Les phénazines sont des composés antimicrobiens, mais elles jouent également de nombreux rôles importants dans la physiologie des *Pseudomonas* (Price-Whelan et al. 2006). Plusieurs molécules de la famille de phénazines, et plus particulièrement l'OH-PCA ont été décrites pour jouer un rôle dans la mise en place et dans l'architecture du biofilm (Maddula et al. 2008, Wang et al. 2016 ; **chapitres 2 et 3 partie A**). L'activité de l'OH-PHZ qui est la molécule la plus impactée dans notre analyse par le mode de vie et par la présence des extraits est en revanche encore peu documentée. L'augmentation de la production des AHLs et des phénazines dans les deux expériences réalisées suggère que les extraits racinaires puissent avoir un impact sur la production de biofilm chez les souches de *P. chlororaphis*.

D'autres molécules dont la production est particulièrement impactée par le mode de vie bactérien et en présence des extraits racinaires sont les molécules lipophiles azotées produites par la souche *P. kilonensis* F113 (**Figure S2, Chapitre 2**). La structure chimique de ces molécules a pu être caractérisée par comparaison de leur fragmentation MSMS en impact électronique avec les données d'une étude réalisée par Hildebrand et Budzikiewicz, en 1986 mais depuis ces travaux de caractérisation, à notre connaissance aucune étude n'a encore étudié leur activité biologique. L'augmentation de leur production en mode biofilm et en présence des extraits racinaires suggère qu'elles puissent avoir des propriétés biologiques associées au mode biofilm et/ou aux interactions plante-bactéries.

La mise en évidence de plusieurs molécules dont la production est impactée à la fois par le mode de vie bactérien et par la présence des extraits de blé suggère que les métabolites racinaires puissent avoir une influence sur le mode de vie des souches de *Pseudomonas*. Pour tester cette hypothèse, nous avons évalué l'impact des extraits racinaires sur la production de biofilm chez les cinq souches de *Pseudomonas* fluorescents.

Matériel et méthode

Mesure de la production de biofilm

La quantification de la production de biofilm a été réalisée sur les souches *P. kilonensis* F113 ; *P. koreensis* JV222 ; *P. chlororaphis* JV497 ; *P. chlororaphis* JV395B et *P. protegens* CHA0 en présence des extraits racinaires des génotypes Adular 797, Bordeaux 13 7973 et Soissons 6607 (GEDEC, Clermont-Ferrand). Les souches de *Pseudomonas* ont été cultivées dans un milieu MM fructose en présence des extraits racinaires méthanoliques des trois génotypes de blé à 50 µg/mL (1% méthanol). La condition contrôle correspond à l'ajout de méthanol pur dans les mêmes proportions (1% méthanol). La préparation des milieux et l'inoculation des souches ont été réalisées selon les mêmes protocoles que ceux présentés dans le **chapitre 3**, puis les micro-plaques ont été incubées à 28°C sous agitation. Après 48h, une mesure de la croissance des souches a été réalisée par mesure de la densité optique à 600 nm à l'aide d'un spectrophotomètre (TECAN, France). Les micro-plaques ont ensuite été incubées à 28°C, durant 72h supplémentaires, sans agitation pour favoriser l'adhésion des cellules et la mise en place

du biofilm. Après 5 jours de culture, la production de biofilm a été mesurée suite à une coloration au cristal violet. Pour cela, les cellules non adhérentes ont d'abord été délicatement retirées puis deux lavages par bain successif avec du NaCl (0.9%) ont été réalisés. Le cristal violet a ensuite été mis en contact des cellules adhérentes pendant 10 min. Il a ensuite été ensuite retiré, puis deux bains successifs avec de l'eau ultrapure. Après une étape de séchage, le cristal violet adsorbé sur les cellules adhérentes a été resolubilisé dans de l'éthanol absolu. Enfin, la densité optique à 595 nm des suspensions a été mesurée à l'aide d'un spectrophotomètre (TECAN, France).

Résultats

Les extraits végétaux favorisent la croissance de toutes les souches dans des proportions différentes avec des effets plus marqués sur les souches JV222, JV395B et F113. Une augmentation de la fraction adhérente des cellules bactériennes a également été mise en évidence chez les souches JV222, JV395B, JV497 et CHA0 (**Figure 1A, C-E**). Chez la souche F113 en revanche la fraction adhérente des cellules est significativement diminuée en présence des extraits. La diminution de la fraction adhérente en présence des extraits concomitante avec une augmentation de la croissance de la souche F113 montre un impact négatif des extraits sur sa production de biofilm (**Figure 1B**).

Chez les autres souches de l'étude, les extraits ont un impact positif sur la croissance et la production de biofilm ; il a donc été nécessaire de comparer l'augmentation de la production de biofilm à l'augmentation de la croissance (Test de comparaison de moyenne paramétrique de Student ; P value < 0.05). Cette comparaison a permis de déterminer si l'augmentation de la fraction adhérente était due à une augmentation du nombre de cellules ou à une réelle induction de la production de biofilm. Chez la souche *P. koreensis* JV222 aucune différence significative n'a pu être mise en évidence entre l'augmentation de la croissance de la souche et l'augmentation de la production de biofilm (**Figure 1A**). Nous ne pouvons par conséquent pas conclure que les extraits racinaires de blé favorisent la production de biofilm chez cette souche. La production de biofilm est en revanche augmentée chez la souche *P. protegens* CHA0 uniquement en présence des extraits racinaires des génotypes Adular et Bordeaux (**Figure 1E**). Les souches dont la production de biofilm est la plus impactée par les extraits sont les deux

souches de *P. chlororaphis* JV395B et JV497 chez qui une augmentation significative de la production de biofilm a pu être mise en évidence en présence des extraits racinaires des trois génotypes de blé (Figure 1C et 1D).

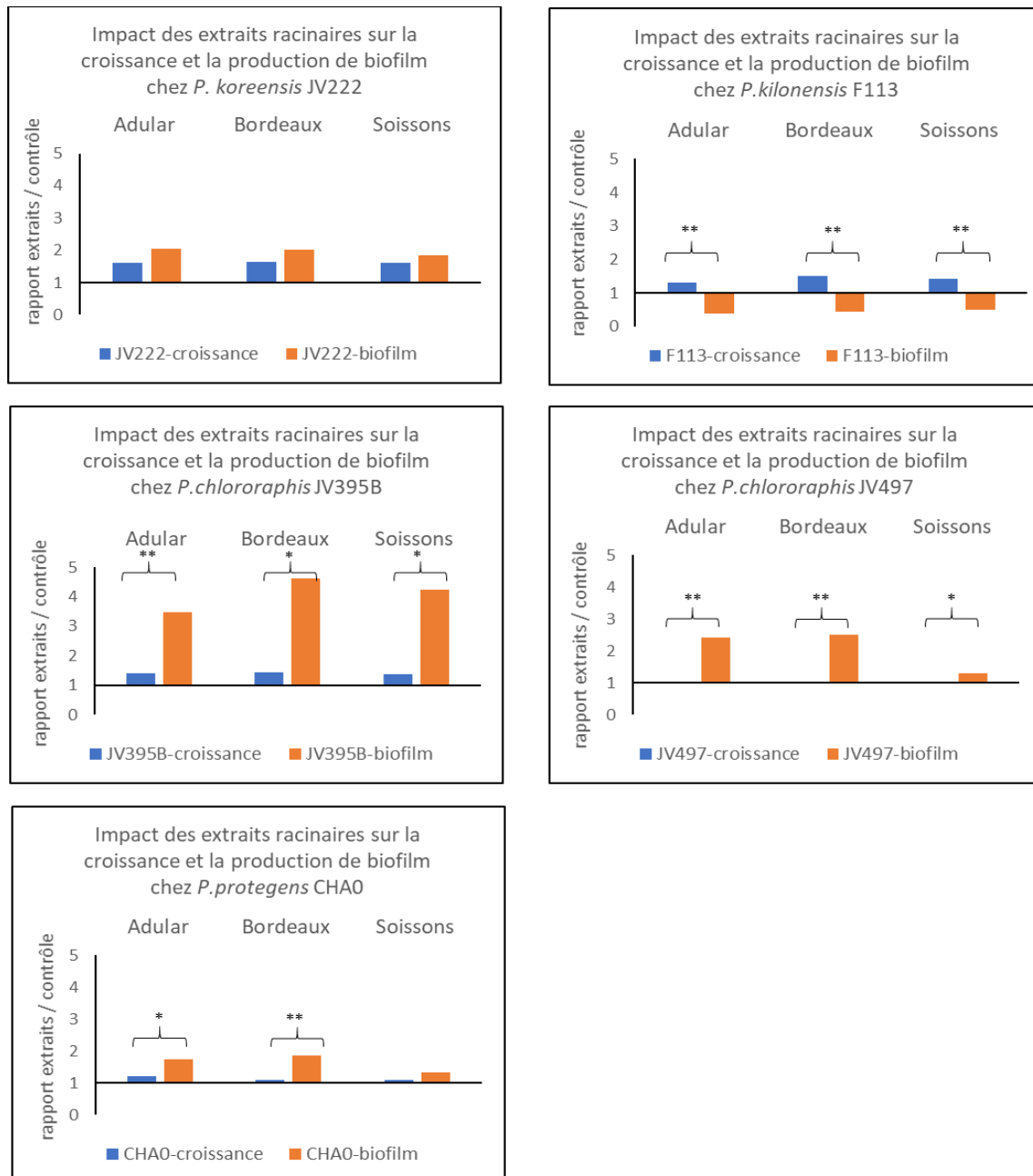


Figure 1 : Impact des extraits racinaires des trois génotypes de blé sur la croissance et la production de biofilm chez cinq souches de *Pseudomonas*. Des rapports des densités optiques mesurées à 600 nm (i.e. croissance mesurée à 48h) et à 595 nm (i.e. production de biofilm mesurée après 5j) ont été réalisés entre les conditions en présence d'extraits racinaires et la condition contrôle. Cette approche a permis de comparer la modification de la croissance à celle de la production de biofilm en présence des extraits racinaires. La comparaison entre les deux rapports pour chaque génotype a été réalisée via un test de Student, P value < 0.05. (* : P value < 0.05 ; ** : P value < 0.001).

Discussion

Le biofilm est le mode de vie préférentiel des bactéries dans l'environnement. Il est très important dans la rhizosphère où il est relié aux mécanismes de colonisation racinaire (Pandín et al. 2017, chapitre 2, Figure 1). Une colonisation efficace des souches est nécessaire pour qu'elles puissent exprimer les fonctions phytobénéfiques qui aideront au développement de la plante (Benizri et al. 2001). Les racines végétales de part leur exsudats et l'architecture de leurs racines ont un impact majeur sur les bactéries rhizosphériques (Bais et al. 2006). Une étude de Beauregard et al en 2013 a notamment montré un impact d'*Arabidopsis thaliana* sur la production de biofilm chez plusieurs souches de *Bacillus*. Les résultats de cette étude montrent qu'un extrait végétal aqueux entraîne une augmentation de la production de biofilm. Cet impact n'a en revanche pas pu être mis en évidence pour des exsudats racinaires d'*A. thaliana*. Des expérimentations complémentaires ont ensuite montré que cette augmentation de biofilm était due à des polysaccharides présents dans les extraits végétaux mais non présents dans les exsudats racinaires. Ces polysaccharides peuvent à la fois induire l'expression de gènes impliqués dans la production de biofilm et servir de substrats pour la production des exopolysaccharides bactériens qui composent la matrice extracellulaire du biofilm (Beauregard et al. 2013, Habib et al. 2017). Les exsudats racinaires d'autres végétaux tels que le maïs ou la tomate peuvent également avoir un impact sur la production de biofilm chez plusieurs souches de *Bacillus* (Pandín et al. 2017). Du fait de la polarité du solvant d'extraction, les extraits racinaires méthanoliques utilisés dans notre étude contiennent probablement beaucoup moins d'exo-polysaccharides que les extraits aqueux utilisés dans les travaux de Beauregard et al. Nous ne pouvons donc pas conclure sur le potentiel effet positif des polysaccharides végétaux sur les biofilms des souches de *Pseudomonas* étudiées.

Notre étude montre des effets contrastés des extraits racinaires sur la production de biofilm en fonction des souches de *Pseudomonas*. La production de biofilm est diminuée par la présence des extraits chez F113, non impactée chez JV222, augmentée chez CHA0 avec des différences observées en fonction des génotypes et augmentée chez les souches de *P. chlororaphis* JV395B et JV497 en présence des extraits des trois génotypes de blé. Ces données montrent que l'impact de la plante sur la production de biofilm est différent en fonction des espèces de *Pseudomonas*.

Chez les souches de *P. chlororaphis*, cette augmentation de biofilm est très probablement reliée à la production d’AHLs et de phénazines. Notre expérimentation n’a en revanche pas permis de différencier (i) si la plante favorise la production d’AHLs et de phénazine ce qui aboutit à une production de biofilm ; ou (ii) si la plante favorise la production de biofilm par d’autres mécanismes ce qui, par la suite favorise la production d’AHLs et de phénazines.

Chez la souche F113, la production de biofilm est diminuée en présence des extraits racinaires. Ces résultats questionnent par rapport à l’activité des molécules lipophiles azotées dont la production est augmentée en mode biofilm-colonie et en présence des extraits racinaires (**Chapitre 2 et 3**). Nous devons néanmoins tenir compte du fait que la forme de biofilm fixée obtenue et quantifiée dans cette étude, est différente de la forme biofilm-colonie analysée dans le chapitre 2. La forme du biofilm peut en effet avoir un impact très important sur le métabolisme des souches et explique la difficulté d’étudier ce mode de vie bactérien (Mikkelsen et al. 2007, Favre et al. 2018). Nous ne pouvons par conséquent pas exclure que ces molécules soient impliquées dans la mise en place d’une forme particulière de biofilm et présentent des propriétés associées à ce mode de vie telles que dans l’agrégation ou encore dans l’expression de propriétés de surfaces.

Conclusion

Ainsi ces résultats montrent que les extraits racinaires ont des impacts différents sur le mode de vie bactérien en fonction de la souche de *Pseudomonas* étudiée. L’augmentation de la production de biofilm est particulièrement importante chez les souches de *P. chlororaphis* et suggère que la plante puisse favoriser la colonisation racinaire de ces souches. A l’inverse le fait que les extraits entraînent une diminution de la production de biofilm chez la souche F113 questionne sur les conséquences de cette diminution sur les interactions de cette PGPR avec la plante hôte. Nous pouvons néanmoins noter que l’analyse du métabolisme secondaire des souches en fonction du mode de vie (**Chapitre 2**) montrait que les souches de *P. chlororaphis* produisaient beaucoup plus de métabolites secondaires en mod biofilm ce qui n’était pas le cas de la souche *P. kilonensis* F113 qui produisait de nombreux métabolites dans les deux modes de vie étudiés. Au vu de ces résultats, nous pouvons nous demander si la mise en place

du phénotype biofilm dans la rhizosphère présente la même importance chez toutes les souches rhizosphériques.

Références

- Bais HP, Weir T L, Perry LG, Gilroy S & Vivanco JM. 2006. the role of root exudates in rhizosphere interactions with plants and other organisms. *Annual Review of Plant Biology*, **57**: 233–266.
- Beauregard PB, Chai Y, Vlamakis H, Losick R & Kolter R. 2013. *Bacillus subtilis* biofilm induction by plant polysaccharides. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **110**: 1621–1630.
- Benizri E, Baudoin E & Guckert A. 2001. Root colonization by inoculated plant growth-promoting rhizobacteria. *Biocontrol Science and Technology*, **11**: 557–574.
- Favre L, Ortalo-Magné A, Pichereaux C, Gargaros A, Burlet-Schiltz O, Cotelle, V & Culioli, G. 2018. Metabolome and proteome changes between biofilm and planktonic phenotypes of the marine bacterium *Pseudoalteromonas lipolytica* TC8. *Biofouling*, **34**: 132–148.
- Flemming HC, Wingender J, Szewzyk U, Steinberg P, Rice S A & Kjelleberg S. 2016. Biofilms: an emergent form of bacterial life. *Nature Reviews Microbiology*, **14**: 563–575.
- Habib C, Yu Y, Gozzi K, Ching C, Shemesh M. & Chai Y. 2017. Characterization of the regulation of a plant polysaccharide utilization operon and its role in biofilm formation in *Bacillus subtilis*. *PLoS ONE*, **12**: 1–24.
- Maddula VSRK, Pierson EA & Pierson LS. 2008. Altering the ratio of phenazines in *Pseudomonas chlororaphis* (*aureofaciens*) strain 30-84: Effects on biofilm formation and pathogen inhibition. *Journal of Bacteriology*, **190**: 2759–2766.
- Mikkelsen H, Duck Z, Lilley K S & Welch M. 2007. Interrelationships between colonies, biofilms, and planktonic cells of *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Bacteriology*, **189**: 2411–2416.
- Morohoshi T, Yamaguchi T, Xie X, Wang W, Takeuchi K & Someya N. 2017. Complete Genome Sequence of *Pseudomonas chlororaphis* subsp. *aurantiaca* Reveals a Triplicate Quorum-Sensing Mechanism for Regulation of Phenazine Production. *Microbes and Environments*, **32**: 47–53.
- Pandin C, Le Coq D, Canette A, Aymerich S & Briandet R. 2017. Should the biofilm mode of life be taken into consideration for microbial biocontrol agents? *Microbial Biotechnology*, **10**: 719–734.
- Price-Whelan A, Dietrich LEP & Newman DK. 2006. Rethinking “secondary” metabolism: physiological roles for phenazine antibiotics. *Nature Chemical Biology*, **2**: 71–78.
- Venturi V & Keel C. 2016. Signaling in the Rhizosphere. *Trends in Plant Science*, **21**: 187–198

Wang D, Yu J M, Dorosky R J, Pierson L S & Pierson E A. 2016. The phenazine 2-hydroxy-phenazine-1-carboxylic acid promotes extracellular DNA release and has broad transcriptomic consequences in *Pseudomonas chlororaphis* 30-84. *PLoS ONE*, **11**: 1–22.

Chapitre 4 : Réponse
métabolique du blé à l'inoculation
de souches de *Pseudomonas*
conditionnées et non conditionnées
par des extraits racinaires

Préambule

La culture des souches selon deux modes de vie différents présenté dans le deuxième chapitre de cette thèse nous a permis de détecter plusieurs métabolites impliqués dans l'activité phytobénéfique des *Pseudomonas*, et de mettre en évidence l'importance du mode biofilm dans la production de métabolites secondaires.

Dans le troisième chapitre, l'analyse des métabolites produits par chacune des souches en présence et en absence des extraits racinaires a été réalisée. Cette approche a permis de mettre en évidence que les métabolites racinaires avaient un impact majeur sur le métabolisme secondaire des souches et pouvaient modifier la production de molécules impliquées dans l'activité phytobénéfique des *Pseudomonas*. Des expériences complémentaires ont également montré que les extraits pouvaient favoriser l'agrégation cellulaire et la production de biofilm chez la souche *P. protegens* CHA0 et les deux souches de *P. chlororaphis* JV395B et JV497.

L'importance de l'impact des extraits racinaires sur le métabolisme secondaire des souches nous a conduit à poser l'hypothèse qu'une bactérie préconditionnée avec un extrait racinaire de blé présentait un impact différent sur le blé lui-même. Afin de vérifier cette hypothèse, nous avons inoculé les souches *P. kilonensis* F113 et *P. chlororaphis* JV395B conditionnées et non conditionnées par des extraits racinaires sur les graines des génotypes Adular et Bordeaux en sol non stérile. Dans cette dernière expérimentation, nous avons cherché à évaluer, premièrement, si les deux souches phytoprotectrices entraînaient des modifications du métabolisme racinaire chez les deux génotypes de blé ; deuxièmement, à savoir si une modification différentielle était induite par les souches F113 et JV395B lorsque ces dernières avaient été préalablement conditionnées avec des extraits racinaires ; enfin troisièmement, à mettre en évidence une éventuelle spécificité de réponse du blé selon s'il est inoculé avec une souche conditionnée par son propre extrait racinaire ou par celui d'un autre génotype de blé.

La première étape de cette dernière expérimentation a été de conditionner les souches F113 et JV395B avec les extraits racinaires des génotypes Adular et Bordeaux. La préparation du milieu et l'inoculation des souches a été réalisé selon le même protocole et les mêmes conditions que dans le chapitre 3. La seule différence est que nous avons choisi de réduire la durée d'incubation à 2,5 jours au lieu de 6 jours comme réalisé dans le chapitre 3. La diminution de la durée d'incubation avait pour objectif de pouvoir inoculer sur les graines de blé, des

souches en fin de phase exponentielle, et présentant un meilleur fitness. Une évaluation des modifications métaboliques induites par les extraits racinaires après 2.5 jours d'incubation a été réalisée et montre également un impact important des extraits racinaires sur le métabolisme secondaire des souches (**Figure S1**). La production des métabolites discriminants précédemment décrits dans le chapitre 3 tels que les AHLs, les phénazines, les dérivés du PDTC ou encore les dérivés lipophiles azotés est également modifiée. L'analyse du métabolisme après 2.5 jours d'incubation n'a en revanche pas permis de mettre en évidence de modification différentielle de la production de phénazines entre la souche JV395B conditionnée par le génotype Adular et celle conditionnée par le génotype Bordeaux. Nous pouvons suggérer que les spécificités entre les génotypes soient plus importantes lorsque les souches sont plus longtemps au contact des extraits racinaires. Après avoir confirmé les modifications métaboliques induites chez les souches conditionnées (**Figure S1**), nous avons inoculé les souches *P. kilonensis* F113 et *P. chlororaphis* JV395B conditionnées et non conditionnées par des extraits racinaires sur les graines des génotypes Adular et Bordeaux en sol non stérile. Nous avons ensuite évalué l'impact de l'inoculation de ces souches sur la croissance et le métabolisme secondaire racinaire de chacun des génotypes.

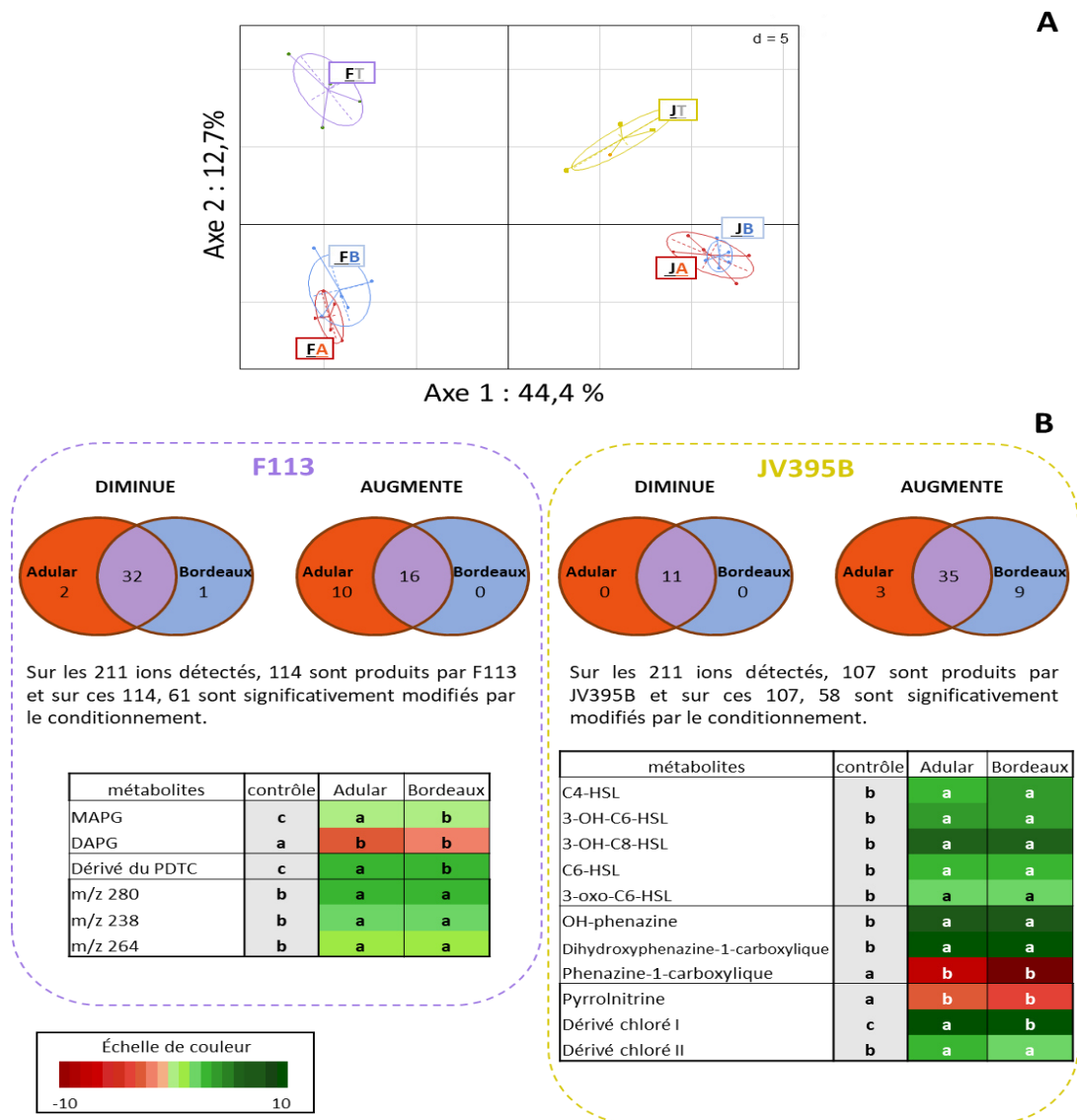


Figure S1 : Impact du conditionnement des souches JV395B et F113 par des extraits racinaires des géotypes Adular et Bordeaux sur leurs métabolismes secondaires respectifs après 2,5 jours d'incubation. ACP montrant les différences entre les métabolome des souches conditionnées et non conditionnées (n = 211) (A), diagrammes de Venn présentant la répartition des métabolites bactériens significativement modifiés lors de l'inoculation (B), associés à des *heatmaps* permettant de voir plus spécifiquement l'impact du conditionnement sur les métabolites bactériens annotés et pouvant être impliqués dans les interactions plante – bactéries. Le premier axe de l'ACP explique 44,4% de la variabilité et sépare les deux souches de *Pseudomonas*, ce qui montre qu'elles produisent des métabolites secondaires différents. Le 2e axe qui explique 12,7% de la variation permet, lui, la séparation entre les souches F113 et JV395B conditionnées et non conditionnées. Le conditionnement est donc le facteur qui a le plus d'impact sur le métabolisme secondaire de chacune des souches de *Pseudomonas* (A). Les composés de m/z 280, 238 et 264 correspondent aux composés lipophiles azotés produits par la souche F113 (B). Les dénominations **FT** et **JT** correspondent aux souches F113 et JV395B non conditionnées ; **FA** et **JA**, aux souches F113 et JV395B conditionnées par le géotype Adular et **FB** et **JB**, aux souches F113 et JV395B conditionnées par le géotype Bordeaux.

Introduction

Le blé exsude au niveau de ses racines une grande diversité de molécules comprenant à la fois des métabolites primaires (i.e. sucres, acides aminés, acides organiques, ...) et des métabolites secondaires (Bais et al. 2006). La présence de ces molécules dans la zone de sol au contact des racines (i.e. la rhizosphère) participe à la sélection de taxa microbiens du sol pour constituer le rhizomicrobiote (Philippot et al. 2013). Le rhizomicrobiote correspond à une communauté microbienne particulière avec une diversité et une abondance différente de celle du sol environnant (Lemamceau et al. 2017). Cette communauté présente des fonctions génétiques capitales pour la santé de la plante (Lemamceau et al. 2017). En effet, les micro-organismes qui composent ce rhizomicrobiote sont par exemple capables de promouvoir la croissance et la santé de la plante par l'expression de différentes fonctions phytobénéfiques (Bais et al. 2006). Parmi ces micro-organismes, on retrouve notamment des bactéries phytoprotectrices capables de protéger la plante contre des attaques de pathogènes (Vacheron et al. 2013). Pour cela, elles utilisent trois stratégies différentes à savoir l'induction de la défense systémique de la plante (ISR), la compétition contre d'éventuels pathogènes et enfin l'antagonisme via la production de composés antimicrobiens (Vacheron et al. 2013).

Les fonctions phytobénéfiques sont généralement médiées par des métabolites secondaires (Venturi and Keel 2016). Or, notre étude présentée dans le chapitre 3 montre que des extraits racinaires de blé contenant des métabolites bioactifs peuvent influencer de manière importante la production de métabolites secondaires chez plusieurs souches de *Pseudomonas* rhizosphériques (Chapitre 3). Des résultats de cette étude ont par exemple montré que des extraits racinaires des génotypes de blé Adular et Bordeaux à 50 µg/mL pouvaient modifier respectivement la production de 39% et 29% des métabolites secondaires produits par la souche F113 et 38% et 28% de ceux produits par la souche JV395B. Plus spécifiquement, cette étude a également montré une modification de la production de métabolites secondaires impliqués dans l'activité phytobénéfique de la souche JV395B tels que les AHLs ou les phénazines avec des spécificités en fonction des génotypes de blé. Chez la souche F113, la présence des extraits n'entraînait pas une augmentation de la production de composés antimicrobiens mais conduisait à une surproduction de composés dont l'activité dans les interactions rhizosphériques est encore inconnue. La production de ces métabolites secondaires bactériens dans la rhizosphère peut, par la suite, entraîner des réponses

physiologiques spécifiques chez la plante hôte (Mathesius et al. 2003, Brazelton et al. 2008, Combes-Meynet et al. 2011).

Au vu de ces données, nous pouvons supposer que les *Pseudomonas* ayant préalablement été en contact avec des extraits racinaires de blé produiront des métabolites secondaires différents dans la rhizosphère et, par conséquent, impacteront alors différenciellement le phénotype de la plante par rapport à des souches n'ayant pas été préalablement au contact de la plante.

Pour vérifier cette hypothèse, nous avons spécifiquement préconditionné les deux souches *P. kilonensis* F113 et *P. chlororaphis* JV395B avec les extraits racinaires des génotypes Adular et Bordeaux donnant lieu à trois conditionnements différents par souches (i.e. non conditionnées, conditionnées par Adular, conditionnées par Bordeaux) (**Figure 1A** et **Figure S1**). Chacun des 6 différents types de cultures bactériennes avec conditionnement a ensuite été inoculé sur chacun des génotypes de blé Adular et Bordeaux aboutissant, avec la condition non inoculée, à un total de 14 conditions différentes (**Figure 1B**). Un suivi de la croissance des génotypes de blé et une analyse de leur métabolites racinaires nous a ensuite permis d'évaluer l'impact de chacune des souches conditionnées ou non sur le phénotype de chacun des génotypes de blé.

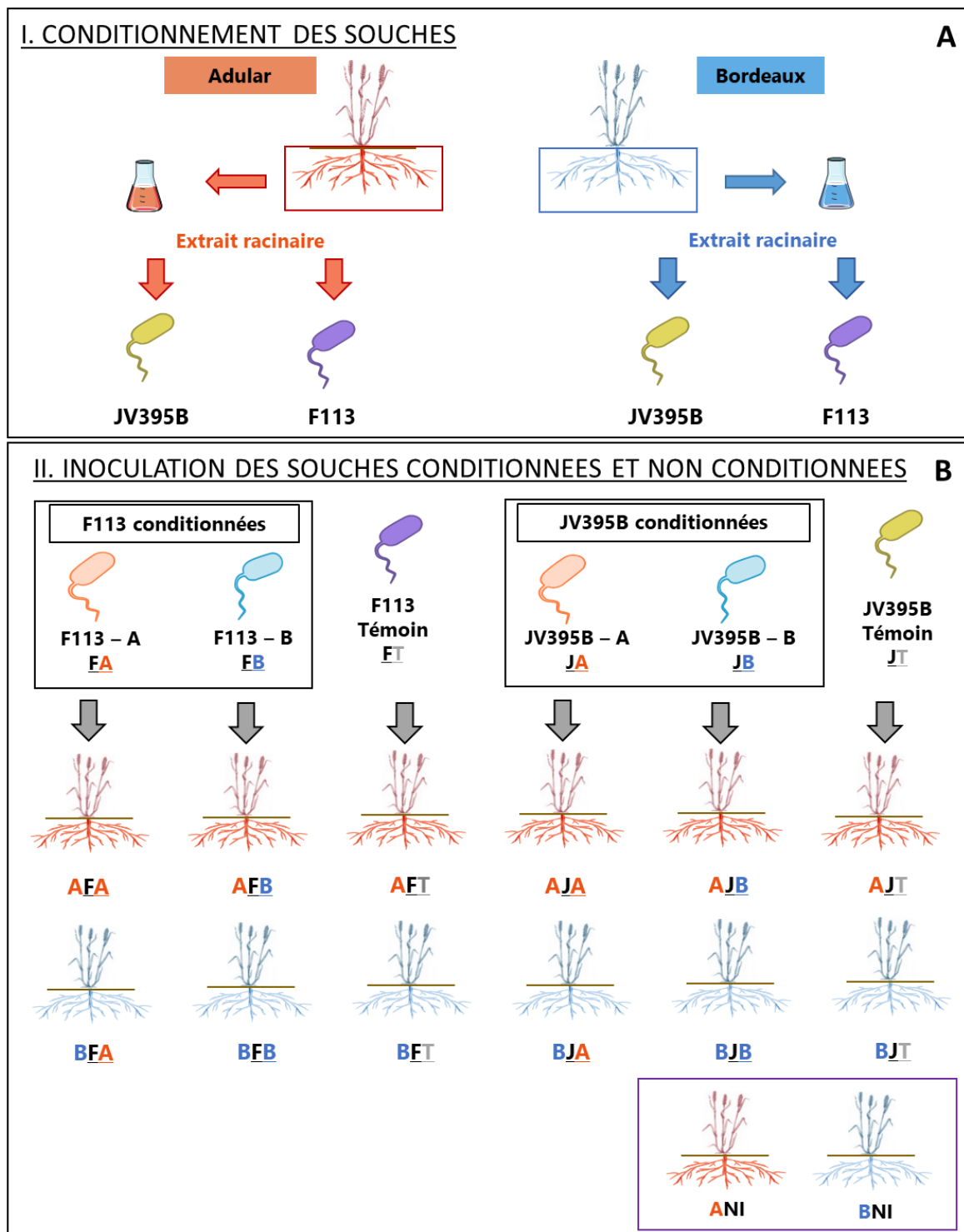


Figure 1 : Schéma résumant le procédé expérimental utilisé pour le conditionnement des souches F113 et JV395B par les extraits racinaires des génotypes Adular et Bordeaux (A) et l'inoculation des souches conditionnées et non conditionnées sur ces mêmes génotypes (B). Les extraits racinaires (50 µg/mL) de chacun des génotypes Adular et Bordeaux ont été mis en contact de chacune des souches F113 et JV395B en milieu de culture liquide (A). Après 2,5 jours de culture en présence des extraits, les souches conditionnées et non conditionnées ont été inoculées sur les génotypes Adular et Bordeaux, donnant lieu à 14 conditions différentes. Un code couleur a été mis en place afin de différencier les différentes conditions (B). Ce même code est utilisé dans toutes les figures.

Matériel et méthode

Matériel biologique

Cette étude a été réalisée sur deux souches PGPR appartenant au groupe des *Pseudomonas* fluorescents, *P. kilonensis* F113 isolée à partir d'une rhizosphère de betterave (Shanahan et al. 1992) et *P. chlororaphis* JV395B isolée à partir du sol de champs cultivés en maïs (Vacheron et al. 2015). Les génotypes de blé tendre (*Triticum aestivum* L.) sont les génotypes Bordeaux 13 7973 (INRA Clermont-Ferrand GEDEC) et Adular 797 (INRA Clermont-Ferrand GEDEC).

Conditionnement des souches bactériennes avant inoculation.

Les souches bactériennes *P. kilonensis* F113 et *P. chlororaphis* JV395B ont préalablement été conditionnées avec les extraits racinaires des génotypes Adular et Bordeaux (Figure 1A). Le conditionnement a été réalisé via un système de culture en bioscreen, dans un milieu MM fructose complété avec les extraits racinaires des génotypes Adular et Bordeaux à la concentration de 50 µg/l⁻¹ (1% méthanol) selon le protocole présenté chapitre 3. Le méthanol étant utilisé comme condition contrôle. Chacune des 6 conditions a été réalisée dans 30 puits différents (N = 30) et la croissance des souches a été mesurée sur une période de 54h.

Après 54h de culture, 200 µL de chacun des puits ont été transférés et regroupés en Eppendorf® pour former 5 réplicats par conditions. Les 1200 µL de culture ont ensuite été centrifugés (10 min, 5500 rpm) dans le but de séparer le milieu de culture des cellules bactériennes. Le surnageant a été transféré dans un nouvel Eppendorf® afin d'extraire les métabolites secondaires bactériens via une extraction liquide / liquide selon le protocole présenté chapitre 3 pour ensuite les analyser par LC-MS (Figure S1). Les culots bactériens ont été repris dans du sulfate de magnésium (MgSO₄) à 10 mM puis regroupés pour former un inoculum final à 2.10⁷ UFC.ml⁻¹ (Figure S2).

Inoculation bactérienne des plantes et croissance végétale

Chacune des cultures des bactéries conditionnées et non conditionnées ont ensuite été inoculées sur les deux génotypes de blé (Figure 1B). Les graines des génotypes Adular et

Bordeaux ont été lavées par agitation dans 40 ml d'eau distillée (8 min ; 50 rpm). Elles ont ensuite été transférées dans les pots de 2 dm³ contenant du sol non stérilisé, tamisé (Ø 4 mm) provenant d'un luvisol d'une ferme expérimentale (La côte saint André, Isère, France). Cinquante microlitres d'inoculum bactérien ont ensuite été déposés sur les graines pour chacune des conditions (**Figure 1B**). Cinquante microlitres de MgSO₄ à 10 mM ont été utilisés pour la condition non inoculée.

Chacun des pots contenait 3 graines et chacune des conditions a été réalisée dans 8 pots différents (soit 24 plantes / condition). Les pots ont ensuite été disposés de façon randomisée avec une rotation tous les deux jours dans des conditions de 16h de jour et 8h de nuit. Le sol a été humidifié tout au long de la culture pour maintenir une humidité à 20% et une mesure des parties aériennes (i.e. longueur des parties aériennes entre le collet et la feuille la plus longue) a été réalisée tout au long de la culture.

Vingt et un jour après l'inoculation, les plants de blé ont été récoltés. Les plants ont été agités afin d'éliminer le sol non adhérent aux racines puis les parties aériennes ont été séparées des parties racinaires. Dans un pot contenant 3 plants, un plant a été utilisé pour les mesures de biomasses racinaires et foliaires sèches après 24h de séchage dans une étuve à 100°C. Les deux derniers plants ont été utilisés pour l'analyse des métabolites secondaires racinaires. Pour cela, ils ont été directement placés dans l'azote liquide afin de bloquer toutes réactions enzymatiques puis ont été lyophilisés durant 72h à -54°C (Alpha 1-4 LSC Christ, Osterode, Germany). Les racines sèches ont ensuite été broyées, en présence de billes en métal, après avoir été plongées dans l'azote liquide, à l'aide d'un vibrobroyeur (TissueLyser II; Qiagen, Courtabœuf, France). Avant l'extraction, 2 racines ont été regroupées aléatoirement pour former un total de 8 réplicats par condition (N = 8). L'extraction des métabolites racinaires a ensuite été réalisée selon le protocole d'extraction au méthanol utilisé chapitre 3. Chaque extrait a ensuite été resolubilisé dans du méthanol à une concentration finale de 10mg.ml⁻¹ avant d'être analysé en LC-MS.

Analyse chromatographie liquide haute performance couplée à la spectrométrie de masse haute résolution.

Les extraits végétaux et bactériens ont été analysés sur un appareil Agilent technologies® Accurate-Mass Q-TOF LCMS 6530, couplé à un système LC 1290 Infinity selon les méthodes d'analyse adaptées aux extraits bactériens et végétaux décrites chapitre 3.

Data processing et analyse statistique

L'analyse métabolomique a été focalisée sur les petites molécules de poids inférieurs à 1000 Da à la fois pour les extraits bactériens et végétaux. Le workflow utilisé pour le « preprocessing » est le même que celui utilisé dans le chapitre 3, mais avec une modification des paramètres. Les paramètres utilisés dans cette étude sont décrits Table S1. L'analyse statistique du conditionnement des souches a été réalisée selon le même protocole décrit dans le chapitre 3.

L'analyse statistique des modifications métaboliques des blés suite à l'inoculation des souches a été réalisée en plusieurs étapes à la fois pour l'analyse de l'inoculation simple (**Figure 2**) et pour celle des souches conditionnées (**Figure 3, 4, 5**). Premièrement, une séparation des conditions a été réalisée par une analyse discriminante (« *PLS discriminant analysis* », PLS-DA) via le package *rolps* ([Thevenot et al. 2015](#)) et a permis mettre en évidence les métabolites impliqués dans la séparation des conditions. Une analyse univariée a ensuite été réalisée sur ces métabolites par un test non paramétrique de Kruskal-Wallis suivi d'un test post hoc avec une correction fdr via le package *agricolae* ([Mendiburu et al. 2015](#)). Enfin une analyse à composante principale (ACP) a été réalisée sur les composés discriminants dans le but de visualiser les différences entre les conditions via le package *ade4* ([Thioulouse et al. 1997](#)).

Lors de l'analyse des modifications métaboliques entraînées par les souches conditionnées et non conditionnées, un regroupement des conditions (i.e. « clustering ») a été réalisé en fonction de la distance euclidienne via l'outil *permutMatrix* ([Caraux et Pinloche 2005](#)). Les métabolites partageant le même comportement ont été regroupés manuellement en fonction des résultats des tests statistiques univariés montrant leurs différences entre les conditions (**Figure 3, 4 et 5**).

Réseau moléculaire

Le réseau moléculaire a été réalisé via le logiciel *Metgem* (Olivon et al. 2018) après un pré-traitement des données via le logiciel *Mzmine 2* selon le même protocole que dans le chapitre 3 (paramètres, **Table S2**).

Résultats

Impact de l'inoculation des souches conditionnées et non conditionnées sur la croissance de la plante.

Après avoir été cultivées ou non en présence d'extraits racinaires de blé, les souches ci-après qualifiées de conditionnées ont été inoculées sur les graines des génotypes Adular et Bordeaux (**Figure 1**). Un contrôle de l'inoculum nous a permis de confirmer qu'un même niveau de population de $2 \cdot 10^7$ UFC. ml⁻¹ avait été inoculé pour chacune des conditions (**Figure S2**). Une mesure de la taille des parties aériennes a été effectuée tout au long de la croissance des plantes et une mesure des biomasses sèches des parties aériennes et racinaires a été réalisée. Ces mesures n'ont pas permis de mettre en évidence d'effet significatif de l'inoculation sur la croissance des deux génotypes de blé. Néanmoins, une légère augmentation de la biomasse des racines du génotype Bordeaux en présence de la souche JV395B conditionnée par ce dernier peut être soulignée (**Figure S3 et S4**).

Impact de l'inoculation des souches *P. kilonensis* F113 et *P. chlororaphis* JV395B sur le métabolisme racinaire des deux génotypes de blé.

Une première analyse en composantes principales sur toutes les conditions (**Figure S5**) montre que la principale différence entre les conditions concerne la différence de métabolisme entre les génotypes Adular et Bordeaux. Nous avons donc choisi de traiter séparément les deux génotypes de blé. Dans un premier temps nous avons évalué l'impact de chacune des deux souches non conditionnées sur le métabolisme secondaire de Adular et Bordeaux (**Figure 2**). Pour cela, nous avons réalisé une analyse statistique multivariée par PLSDA pour chaque génotype inoculé et non inoculé par chacune des 2 souches (**Figure 2**). Les modèles de PLSDA ont été validés par un test de permutations (Souard et al. 2018) et présentent des paramètres Q2 de 0,80 et 0,69 pour les génotypes Adular et Bordeaux respectivement. Les modèles ont

permis de mettre en évidence des métabolites végétaux impliqués dans la séparation entre les conditions. Une analyse univariée a ensuite été réalisée sur ces métabolites (Test de Kruskal-Wallis ; P value $<0,05$; $n=7$), permettant de mettre en évidence les métabolites dont la quantité dans les racines est significativement modifiée par l'inoculation des souches. Cette approche a montré que respectivement 19,6% et 14,1% des métabolites chez Adular et Bordeaux sont différenciellement produits lorsque les plantes sont inoculées. Des ACP réalisées sur les composés discriminants de chacun des génotypes montrent que toutes les conditions sont séparées sur les deux axes principaux qui expliquent un total de 47,6 et 44,4% de la variabilité des données chez Adular et Bordeaux respectivement (**Figure 2**).

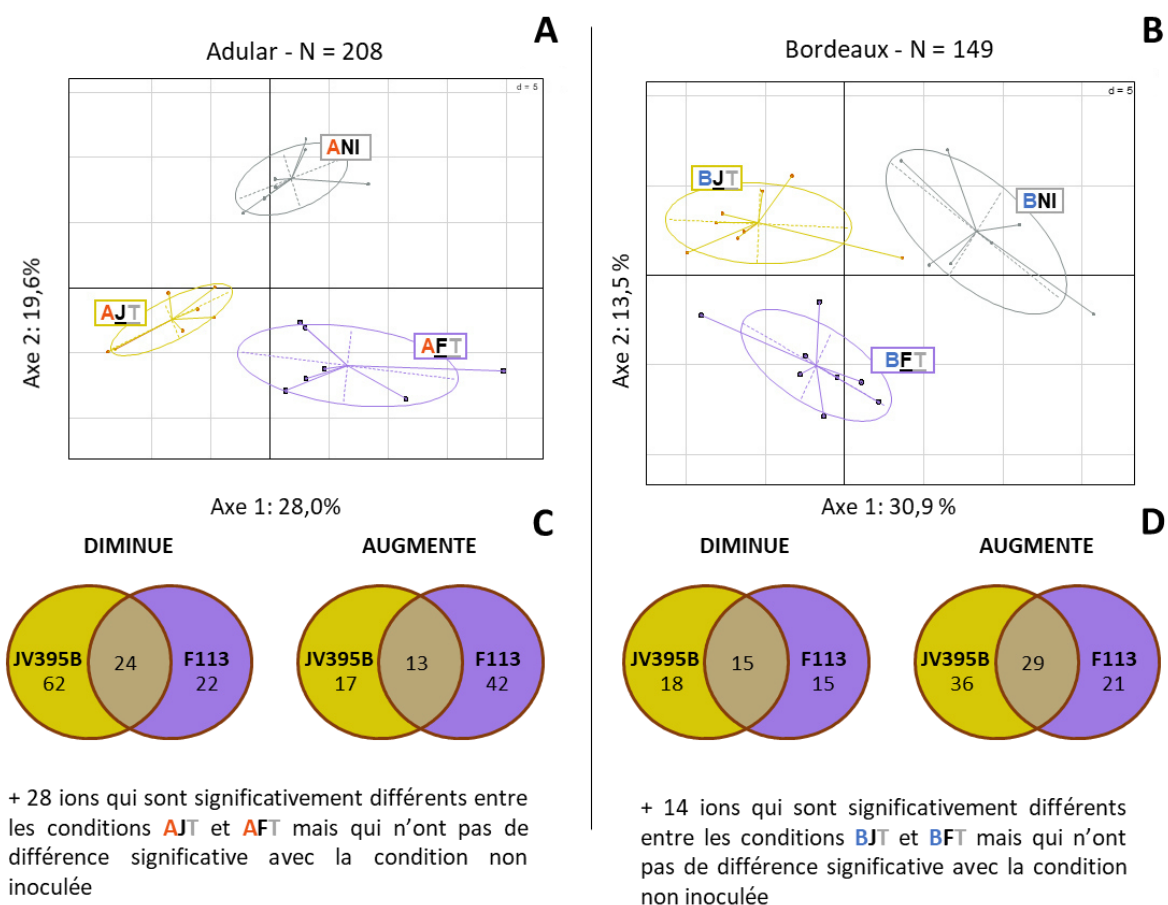


Figure 2 : Impact des inoculations des souches JV395B et F113 (non conditionnées) sur le métabolisme secondaire racinaire des deux génotypes de blé Adular (A, C) et Bordeaux (B, D). ACP sur les ions significativement discriminants (A, B) associées à des diagrammes de Venn (C, D) montrant la répartition des métabolites en fonction des conditions.

Les géotypes Adular et Bordeaux semblent répondre de façon différente à l'inoculation des souches. Chez le géotype Adular, l'axe 1 (28% de la variabilité) sépare le métabolisme racinaire des plantes inoculées avec la souche JV395B de celles inoculées avec la souche F113, montrant une potentielle spécificité de réponse d'Adular à l'inoculation des deux souches (**Figure 2A**). En effet, parmi la grande majorité des métabolites discriminants par rapport à la condition non inoculée (NI), l'inoculation par chacune des souches n'impacte pas les mêmes métabolites (i.e. peu de métabolites communs) (**Figure 2C**). De plus il y a 28 métabolites qui présentent des différences significatives entre les deux inoculations, mais pas avec la condition NI (**Figure 2C**). La répartition des métabolites discriminants montre également que sur le géotype Adular, l'inoculation de JV395B entraîne plutôt une diminution de la production des métabolites alors que F113 entraîne plutôt une augmentation. Le géotype Bordeaux semble moins impacté par l'inoculation et présente 50 composés discriminants de moins que le géotype Adular. Pour ce géotype, l'axe 1 (30,9% de la variabilité) sépare les conditions inoculées et la condition NI (**Figure 2B**). La répartition des métabolites montre que l'inoculation de la souche JV395B entraîne plus de modifications (98 métabolites) que celle de la souche F113 (80 métabolites) par rapport à la condition NI (**Figure 2D**). Au vu des hétérogénéités de réponse en fonction de géotypes et des souches inoculées, l'impact de l'inoculation des souches conditionnées en présence d'extraits racinaires de blé sur le métabolisme des géotypes de blé a été évalué séparément pour chaque interaction géotype × souche.

Impact de l'inoculation des souches *P. kilonensis* F113 et *P. chlororaphis* JV395B conditionnées sur le métabolisme racinaire des deux géotypes de blé.

Les PLSDA réalisées sur le jeu de données ont montré des modèles significatifs pour les interactions Adular × JV395B, Adular × F113 et Bordeaux × JV395B avec des paramètres Q2 respectifs de 0,82, 0,41 et 0,62. Aucun modèle permettant une séparation significative des conditions n'a pu être généré pour l'interaction Bordeaux × F113. Ceci montre que le métabolisme racinaire du géotype Bordeaux n'est impacté que de façon mineure par la souche F113 et/ou que le conditionnement de la souche F113 a peu d'impact sur la réponse des racines de Bordeaux à l'inoculation.

Pour les interactions présentant un modèle PLS-DA significatif, des ACP ont été réalisées sur les composés significativement discriminants afin de visualiser les différences entre les conditions (**Figure 3A, 4A et 5A**). Des cartes de chaleur (*heatmap*), associées à un regroupement (*clustering*) des conditions les plus proches, représentent la répartition des métabolites discriminants en fonction des variations de leur quantité dans les différentes conditions. Elles sont associées à chaque ACP afin de visualiser la réponse des métabolites végétaux à l'inoculation par les souches conditionnées ou pas. Les métabolites présentant les mêmes évolutions de leurs quantités dans les conditions sont répartis au sein de différents *clusters* caractéristiques (**Figure 3B, 4B et 5B**).

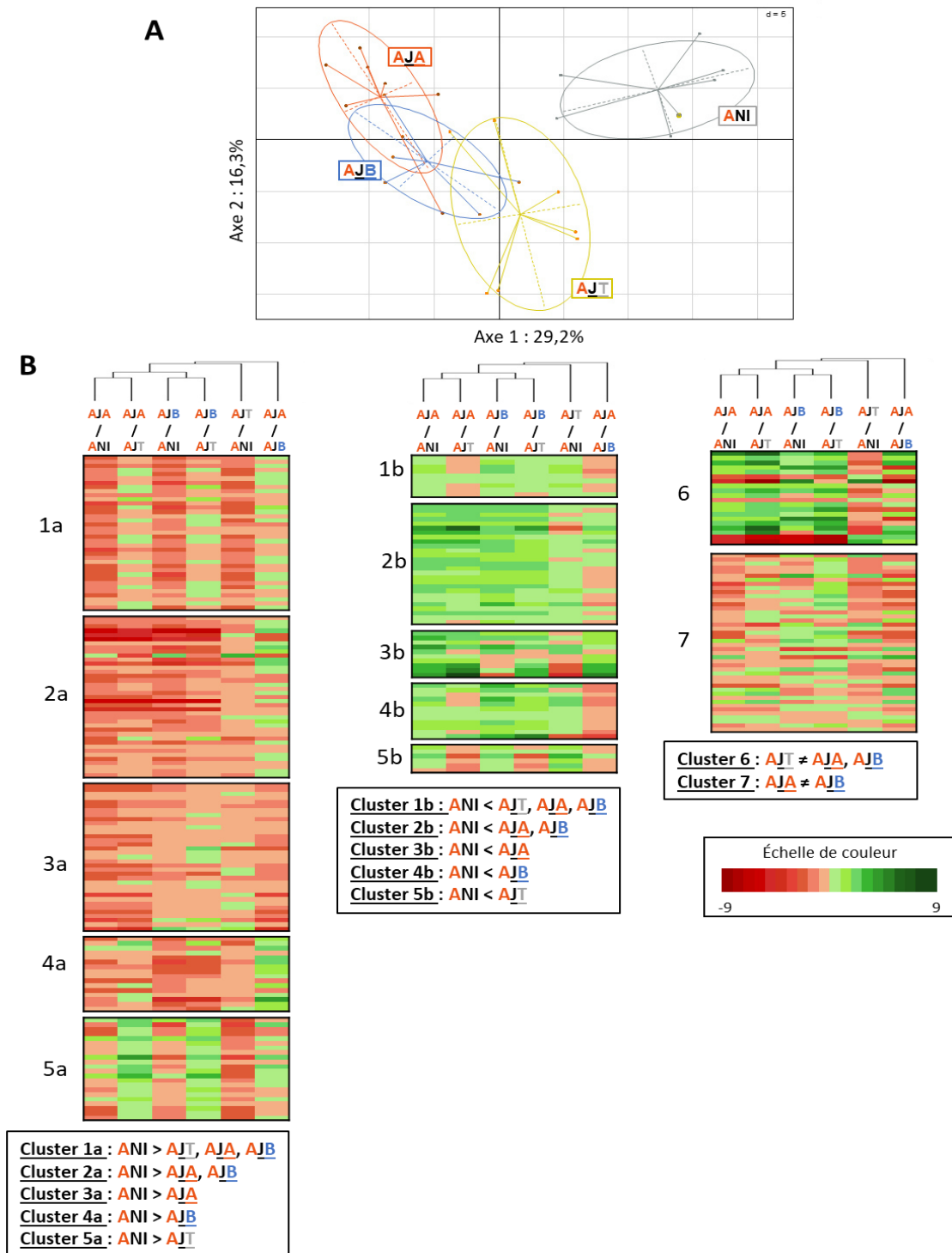


Figure 3 : Impact de la souche JV395B conditionnée et non conditionnée sur le métabolisme secondaire racinaire du génotype Adular. ACP sur les ions significativement discriminants (N = 277) (A) et regroupement des métabolites végétaux en fonction de leurs réponses à l'inoculation de la souche non conditionnée ou conditionnée par les extraits des différents génotypes de blé (B). Chaque cluster représente un type de comportement différent. Le **cluster 1** représente les métabolites significativement diminués (a) ou augmentés (b) par l'inoculation de JV395B ; le **cluster 2** les métabolites significativement diminués (a) ou augmentés (b) par l'inoculation de JV395B conditionnée ; le **cluster 3** les métabolites significativement diminués (a) ou augmentés (b) par l'inoculation de JV395B conditionnée par le

génotype Adular ; le **cluster 4** les métabolites significativement diminués (a) ou augmentés (b) par l'inoculation de JV395B conditionnée par le génotype Bordeaux ; le **cluster 5** les métabolites significativement diminués (a) ou augmentés (b) uniquement par l'inoculation de JV395B non conditionnée ; le **cluster 6** les métabolites dont la production est inversement modulée entre l'inoculation par JV395B conditionnée et non conditionnée et enfin le **cluster 7** les métabolites dont la production est modulée de façon significativement différente selon si la souche a été conditionnée par des extraits racinaires du génotype Bordeaux ou Adular.

L'interaction Adular × JV395B (**AJ**) est celle pour laquelle la PLSDA présente la valeur du paramètre Q2 la plus élevée et la séparation entre les conditions la plus robuste (**Figure 3**). L'ACP permet de mettre en évidence que, premièrement la séparation de toutes les conditions se fait surtout selon un gradient le long de l'axe 1 qui représente 29,2% de la variabilité. Deuxièmement, la condition NI est la condition la mieux séparée des autres. Enfin, troisièmement, les plantes inoculées avec la souche conditionnée (**AJA** et **AJB**) ont des métabolismes plus éloignés de la condition NI que celles inoculées avec la souche non conditionnée (**AJT**). La répartition des métabolites (**Figure 3B**) montre que la majorité des métabolites sont répartis dans les dix premiers *clusters* (i.e. *clusters* 1a à 5a et 1b à 5b) représentant les métabolites végétaux pour lesquels la principale différence est par rapport à la condition NI. Parmi ces composés, la majorité est diminuée lorsque la plante est inoculée par JV395B. Les composés diminués, peuvent en revanche l'être de façon différente en fonction des conditions. En effet, seuls ceux présentés dans le *cluster* 1a sont diminués par la souche JV395B conditionnée et non conditionnée. Les métabolites classés dans les autres *clusters* (2a, 3a, 4a et 5a), représentant 40,4 % des métabolites discriminants, sont diminués dans des proportions significativement différentes selon si la souche est conditionnée ou pas. Le *cluster* 2a représente les métabolites significativement modifiés uniquement en présence des souches conditionnées, les *clusters* 3a et 4a uniquement en présence des souches conditionnées respectivement par un des génotypes Adular ou Bordeaux, et enfin le *cluster* 5a uniquement en présence de la souche JV395B non conditionnée. Le même système de *cluster* a été utilisé pour les métabolites dont la production est augmentée par l'inoculation (i.e. 2b, 3b, 4b et 5b). Pour les métabolites augmentés ou diminués par rapport à la condition NI, les *clusters* qui présentent respectivement le plus de métabolites sont les *clusters* 2a et 2b montrant que la modification de la production des métabolites végétaux est d'autant plus importante lorsque les souches sont conditionnées. Enfin, les deux derniers *clusters* (i.e. 6 et 7) montrent les

métabolites pour lesquels la principale différence n'est pas par rapport à la condition NI. Le *cluster* n°6 contient les métabolites pour lesquels la principale différence se situe entre l'inoculation par JV395B conditionnée et non conditionnée. Le *cluster* n°7, quant à lui, représente les métabolites pour lesquels la principale différence est entre les inoculations par la souche conditionnée par Adular vs Bordeaux (**AJA** et **AJB**). Ce *cluster* représente 14% des métabolites discriminants et montre que la production de certains composés peut être significativement modulée selon le conditionnement des souches.

En ce qui concerne l'interaction Adular × F113, l'ACP montre que, dans ce cas également, la condition NI est la condition la plus éloignée des autres (**Figure 4A**). On retrouve également un gradient selon l'axe 1 qui explique 29,5% de la variabilité, avec un impact plus important des souches conditionnées sur le métabolisme racinaire. L'inoculation de F113 conditionnée par des extraits du génotype Bordeaux (**AFB**) est également séparé des autres conditions selon l'axe 2, qui explique 22% de la variabilité. On peut également noter que cette condition est celle qui présente le plus de variabilité entre les réplicats (**Figure 4A**). Les métabolites discriminants sont regroupés sur la *heatmap* selon le même système de *clusters* que précédemment (**Figure 4B**). Comme pour l'interaction Adular × JV395B, la majorité des métabolites sont classés dans les dix premiers *clusters* et présentent donc une différence de production entre les conditions inoculées et celle non inoculée. En revanche, contrairement à l'inoculation par la souche JV395B, ici les métabolites sont plutôt augmentés par l'inoculation de la souche F113. Dans cette interaction F113 × Adular, la condition qui entraîne le plus de modification métabolique est la condition **AFB** représentée par les *clusters* 4b et le *cluster* n°8. Ce dernier *cluster* est spécifique de cette interaction, il montre les métabolites dont le comportement est similaire entre les conditions NI et **AFB**. L'importance de ces deux *clusters* souligne l'impact particulier de la souche F113 conditionnée par l'extrait du génotype Bordeaux.

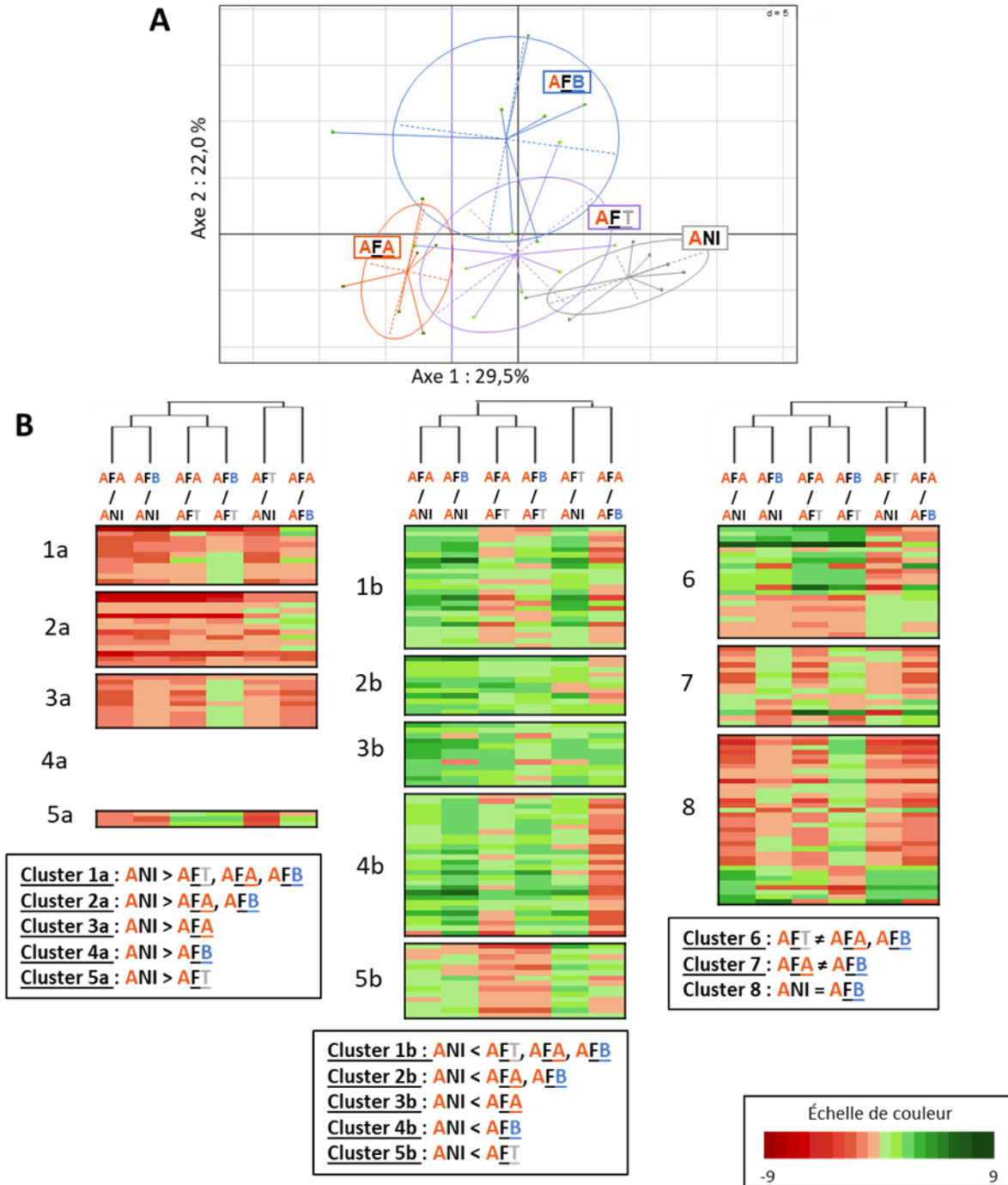


Figure 4 : Impact de la souche F113 conditionnée et non conditionnée sur le métabolisme racinaire du génotype Adular. ACP sur les ions significativement discriminants (N = 197) (A) et regroupement des métabolites végétaux en fonction de leurs réponses à l'inoculation de la souche non conditionnée ou conditionnée par les extraits des différents génotypes de blé (B). Chaque cluster représente un type de comportement différent. Le **cluster 1** représente les métabolites significativement diminués (a) ou augmentés (b) par l'inoculation de F113 ; le **cluster 2** les métabolites significativement diminués (a) ou augmentés (b) par l'inoculation de F113 conditionnée ; le **cluster 3** les métabolites significativement diminués (a) ou augmentés (b) par l'inoculation de F113 conditionnée par le génotype Adular ; le **cluster 4** les métabolites significativement diminués (a) ou augmentés (b) par l'inoculation de F113 conditionnée par le génotype Bordeaux ; le **cluster 5** les métabolites significativement diminués

(a) ou augmentés (b) uniquement par l'inoculation de F113 non conditionnée ; le **cluster 6** les métabolites dont la production est inversement modulée entre l'inoculation par F113 conditionnée et non conditionnée ; le **cluster 7** les métabolites dont la production est modulée de façon significativement différente selon si F113 a été conditionnée par des extraits racinaires du génotype Bordeaux ou Adular et enfin le **cluster 8** les métabolites présentant des comportement similaire entre la condition non-inoculée et la condition inoculée avec la souche F113 conditionnée avec un extrait racinaire du génotype Bordeaux.

Enfin l'analyse statistique réalisée sur l'interaction Bordeaux × JV395B montre que le génotype Bordeaux présente 130 métabolites discriminants de moins que l'interaction Adular × JV395B et semble donc moins impacté par l'inoculation (**Figure 5**). Néanmoins, l'ACP montre que, comme pour les autres interactions, la condition NI est la condition la plus éloignée des autres avec une séparation selon l'axe 1 qui explique 22,8% de la variabilité (**Figure 5A**). La condition représentant le métabolisme du génotype Bordeaux inoculé avec la souche JV395B conditionnée par un extrait racinaire d'Adular (**BJA**) est également séparée des autres selon l'axe 2 de l'ACP qui explique 14,5% de la variabilité. Contrairement à ce qui a été mis en évidence chez le génotype Adular, on ne retrouve pas de gradient de réponses entre la souche conditionnée par les 2 génotypes et non conditionnée. Si on regarde la *heatmap* associée à l'ACP (**Figure 5B**), on peut voir que la condition **BJA** est plus particulièrement séparée des autres conditions, confirmant le comportement atypique de la souche JV395B conditionnée par Adular. En effet, une part importante (21,7%) des métabolites discriminants est classée dans les *clusters* 3a et 3b montrant que ces derniers sont spécifiquement augmentés ou diminués dans la condition **BJA** par rapport à la condition NI.

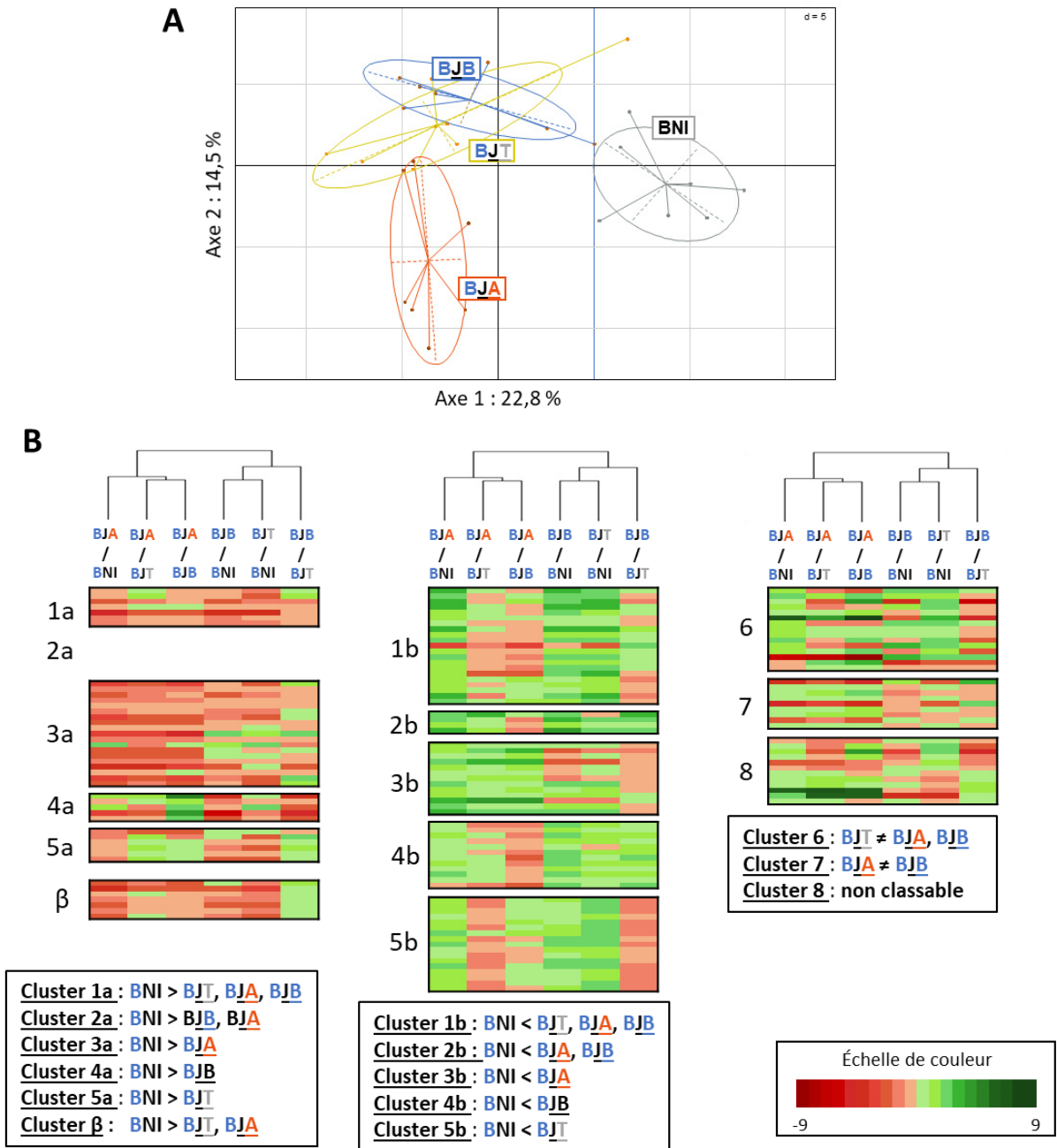


Figure 5 : Impact de la souche JV395B conditionnée et non conditionnée sur le métabolisme secondaire racinaire du génotype Bordeaux. ACP sur les ions significativement discriminants (N = 147) (A) et regroupement des métabolites végétaux en fonction de leurs réponses à l'inoculation de la souche non conditionnée ou conditionnée par les extraits des différents génotypes de blé (B). Chaque cluster représente un type de comportement différents. Le **cluster 1** représente les métabolites significativement diminués (a) ou augmentés (b) par l'inoculation de JV395B conditionnée et non conditionnée ; le **cluster 2** métabolites significativement diminués (a) ou augmentés (b) par l'inoculation de JV395B conditionnée par les 2 génotypes ; le **cluster 3** les métabolites significativement diminués (a) ou augmentés (b) par l'inoculation de JV395B conditionnée par le génotype Adular ; le **cluster 4** les métabolites significativement diminués (a) ou augmentés (b) par l'inoculation de JV395B conditionnée par le génotype Bordeaux ; le **cluster 5** les métabolites significativement diminués (a) ou augmentés (b) uniquement par l'inoculation de JV395B non conditionnée ; le **cluster 6** les métabolites dont la

production est inversement modulée entre l'inoculation par JV395B conditionnée et non conditionnée ; le **cluster 7** les métabolites dont la production est modulée de façon significativement différente selon si la souche a été conditionnée par des extraits racinaires du génotype Bordeaux ou Adular et enfin le **cluster 8** les métabolites présentant des comportements atypiques et difficilement classables dans un cluster donné. Dans cette interaction, il y a également présence d'un cluster spécifique, le cluster β , représentant les métabolites significativement diminués par l'inoculation de JV395B non conditionnée et conditionnée par le génotype Adular

Impact de l'inoculation des souches *P. kilonensis* F113 et *P. chlororaphis* JV395B conditionnées sur la production de métabolites secondaires bioactifs chez le génotype Adular.

Les résultats de l'analyse métabolomique non ciblée des racines de blé inoculées et non inoculées montre que le génotype Adular répond de façon plus marquée à l'inoculation des souches de *Pseudomonas*, particulièrement lorsqu'elles sont conditionnées. Nous avons donc cherché à aller plus loin pour caractériser la réponse de ce génotype à l'inoculation. Pour cela, nous avons réalisé une approche de réseaux moléculaires couplée à une analyse statistique (Test univarié non paramétrique de Kruskal-Wallis, correction fdr, P value < 0.05) afin de mettre en évidence les composés discriminants sur le réseau. Cette méthode nous a permis de détecter les métabolites discriminants appartenant à des familles chimiques connues. (**Figure 6**). Le réseau moléculaire a été réalisé sur 311 ions ayant une fragmentation de bonne qualité. Sur ces ions, 72 ont pu être regroupés dans des familles de plus de 2 composés. Le réseau moléculaire permet la mise en évidence de 3 familles de molécules principales : les acides hydroxycinnamiques, les benzoxazinoïdes et les flavonoïdes. La phénylalanine est également représentée sur le réseau. Enfin, trois autres groupes composés encore inconnus avec des signatures communes ont également été mis en évidence (**Figure 6**). Des composés discriminants ont pu être mis en évidence dans 5 des 6 groupes, particulièrement dans ceux représentant des familles de métabolites connus. La *heatmap* associée à chacune des familles de métabolites bioactifs permet de visualiser dans quelles conditions les métabolites sont différenciellement produits, et à quel *cluster* ils appartiennent sur l'analyse non ciblée (**Figure 3A, 4A, 5A**),

Neuf composés de la famille des benzoxazinoïdes ont pu être mis en évidence sur le réseau (**Figure 6**). La majorité des dérivés benzoxazinoïdes ont leur production modifiée suite

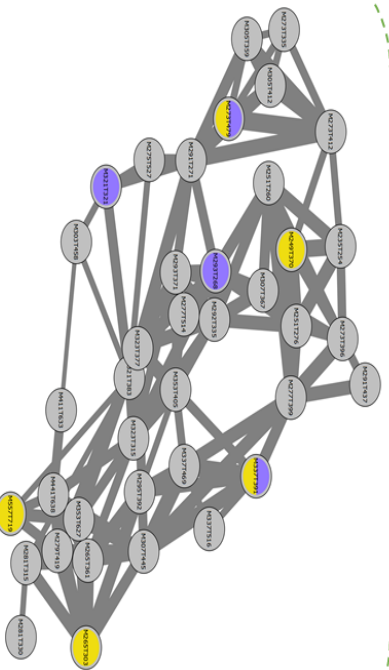
à l'inoculation. Quatre d'entre eux sont spécifiquement modifiés par l'inoculation de JV395B, un par celle de F113 et 2 par celle des deux souches. De façon intéressante, l'inoculation des souches F113 et JV395B a tendance à entraîner une diminution des benzoxazinoïdes glycosylés (BZX-Glc) et une augmentation des dérivés non glycosylés (BZX) et du MBOA avec des différences au niveau de leurs proportions dans les différentes conditions (**Figure 6**). Ainsi, l'inoculation de la souche JV395B induit une baisse significative des BZX-Glc avec des différences selon si la souche est conditionnée ou pas. En effet, seul le DIBOA-Glc est significativement diminué après inoculation de la souche conditionnée et non conditionnée. Le DHBOA-Glc et le DIMBOA-Glc sont, eux, diminués de façon significative dans les conditions **AJA** et **AJB**, avec une diminution plus marquée pour le DIMBOA-Glc dans la condition **AJA**. Enfin le HMBOA-Glc n'est diminué de façon significative que dans la condition **AJB**. L'inoculation de la souche JV395B entraîne également une modification de la production du DIMBOA et du HDMBOA. Pour ces BZX, l'impact de l'inoculation de la souche conditionnée ou pas est plus contrasté. Le DIMBOA est diminué dans les conditions **AJA** et **AJT** et le HDMBOA est inversement impacté selon si la souche est conditionnée ou non conditionnée. L'inoculation de F113 n'a, elle, que très peu d'impact sur les BZX-Glc. En revanche, elle entraîne une augmentation significative des BZX et du MBOA. L'inoculation de la souche F113 présente également des différences si la souche a été conditionnée ou pas. En effet, le MBOA est modifié dans les conditions **AFA** et **AFB**, le DIMBOA dans la condition **AFB** et le HDMBOA dans la condition **AFA**. Toutes ces modifications montrent un effet marqué de l'inoculation des souches F113 et JV395B sur la production de benzoxazinoïdes, particulièrement lorsque les souches ont été préalablement conditionnées avec des extraits racinaires. De plus un contraste a été mis en évidence entre la production des BZX-Glc et des autres dérivés.

Quarante-et-un acide hydroxycinnamique (HCA) et hydroxycinnamique amide (HCAA) ont été détectés dans les extraits racinaires de blé. Trois dérivés ont une production significativement modifiée suite à l'inoculation de la souche JV395B, deux suite à l'inoculation de F113 et deux, suite à l'inoculation des deux souches. Plusieurs dérivés sinapoyl, coumaroyl et feruloyl ont pu être mis en évidence, particulièrement la sinapoyl-agmatine, la feruloyl-putrescine et la coumaroyl-cadaverine. La sinapoyl-agmatine et la feruloyl-putrescine sont plutôt augmentées par l'inoculation des deux souches alors que la coumaroyl-cadaverine a tendance à être diminuée (**Figure 6**).

Une autre famille de molécules dont la production est affectée par l'inoculation est la famille des flavonoïdes dont trois composés ont été détectés dans les extraits. Ces trois flavonoïdes présentent des spectres UV caractéristiques de l'apigénine et leur fragmentation suggère une glycosylation sur des atomes de carbone, correspondant à des dérivés (apigénine-6-C-arabinoside-8-C-hexoside, [Dinelli et al. 2011](#)) aussi appelés schaftoside et isoschaftoside (**Chapitre 3, Table 1**). La production de deux des isomères est modifiée par l'inoculation des souches. L'inoculation de JV395B entraîne une diminution importante de la production du schaftoside I, particulièrement lorsque la souche est conditionnée. Il y a aussi une forte tendance à une diminution de la production du schaftoside II, mais cette diminution est non significative du fait de la variabilité des données. La production des schaftosides est également modifiée par l'inoculation de la souche F113 particulièrement dans les conditions **AFA** et **AFT** (**Figure 6**).

La phénylalanine est également fortement diminuée suite à l'inoculation des deux souches, particulièrement de JV395B lorsqu'elle est conditionnée avec des extraits de blé (**Figure 6**).

ACIDES HYDROXYCINAMMIQUES



NOM	identification	N°	ANI	AET	AFA	AEB	N°	ANI	AJT	ALA	AJB
Dérivé coumaroyl	M2931268	6	a	a	ab	b					
Dérivé feruloyl	M3211321	8	b	a	a	b					
Sinapoyl-agnatine	M3371391	8	b	a	a	b					
Feruloyl putrescine	M2651303										
Coumaroyl-cadaverine	M2491370										
Dérivé feruloyl	M5571719										
Dérivé coumaroyl	M2731479										

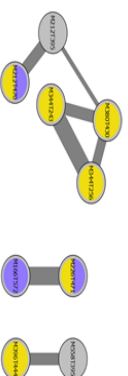
PHENYLALANINE

N°	ANI	AET	AFA	AEB
8	a	b	b	a

N°	ANI	AJT	ALA	AJB
8	a	b	c	c

NOM	identification	N°	ANI	AET	AFA	AEB	N°	ANI	AJT	ALA	AJB
MBOA	M1661572										
DHBOA-glc	M3441243										
DIBOA-glc	M3441256										
HMBOA-glc	M3581430										
DIMBOA-glc	M3961444										
DIMBOA	M2121470										
Putative HDMBOA	M2261471										

BENZOXAZINOIDES



FLAVONOIDES

NOM	identification	N°	ANI	AET	AFA	AEB	N°	ANI	AJT	ALA	AJB
Schaftoside I	M5651529	3qt	a	ab	b	ab					
Schaftoside II	M5651500	8	a	b	b	a					

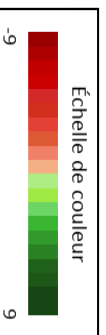


Figure 6 : Réseau moléculaire obtenu après analyse MSMS des extraits racinaires du génotype Adular inoculé et non inoculé, associé à des heatmap présentant la production différentielle des métabolites discriminants en fonction des différentes conditions. Les couleurs sur les nœuds représentent les métabolites discriminants après inoculation de la souche *P. kilonensis* F113 (violet) et *P. chlororaphis* JV395B (jaune) conditionnées et non conditionnées.

Discussion

Dans cette étude, nous avons évalué la réponse métabolique racinaire des deux génotypes de blé Adular et Bordeaux à l'inoculation de 2 souches phytobénéfiques *P. chlororaphis* JV395B et *P. kilonensis* F113. L'inoculation de chacune des souches entraîne des réponses métaboliques spécifiques de chacun des génotypes de blé au niveau des racines (**figure 2**). De façon intéressante, chacun des deux génotypes répond de façon différente aux inoculations bactériennes (**Figure 2**). Chez le génotype Adular, les deux souches ont un effet contrasté et induisent des modifications de production de métabolites différentes (**Figure 2A**). Pour le génotype Bordeaux en revanche, le nombre de métabolites ayant une production modifiée est plus réduit (**Figure 2B**). Les spécificités de réponse des génotypes à chacune des souches peuvent être influencées par plusieurs facteurs. Premièrement, la distance phylogénétique entre les souches. En effet sur l'arbre phylogénétique des *Pseudomonas*, la souche F113 appartient au sous-groupe des *P. corrugata* et JV395B au sous-groupe des *P. chlororaphis* pouvant expliquer des physiologies différentes (Vacheron et al. 2016). Deuxièmement, les métabolites impliqués dans l'activité phytobénéfique sont différents entre les deux souches. La souche F113 est connue pour avoir un effet phytobénéfique sur le blé, principalement via la production d'un composé antimicrobien, le DAPG (Chapitre 2, Valente et al. 2020). La souche JV395B, elle, produit d'autres métabolites secondaires bioactifs tels que les phénazines ou la pyrrolnitrine (Chapitre 2, Selin et al. 2010, Mazzola et al. 1992). Enfin, la souche JV395B est capable de produire au moins 6 AHLs différentes, ce qui n'est pas le cas pour la souche F113 (chapitre 2). Ces données indiquent donc une spécificité d'interaction souche × génotypes. Une même spécificité a pu être mise en évidence lors de l'inoculation de plusieurs souches phytostimulatrices du genre *Azospirillum* sur deux génotypes de maïs (Walker et al. 2011). De la même façon, une étude de Valette et al. en 2019 a montré des profils métaboliques racinaires différents en réponse à plusieurs souches phytostimulatrices appartenant à des genres différents. En revanche, cette spécificité de réponse en fonction des souches n'a pas pu être reliée à l'espèce bactérienne, l'origine des souches inoculées ou encore leur niveau de colonisation, montrant la complexité de ces interactions (Valette et al. 2019).

Une étude réalisée précédemment a montré que la production des métabolites secondaires impliqués dans les propriétés phytobénéfiques des souches F113 et JV395B était fortement influencée par les métabolites racinaires des génotypes Adular et Bordeaux

(Chapitre 3). Nous avons donc, dans un second temps, cherché à évaluer si l'inoculation des souches F113 et JV395B conditionnées par les extraits racinaires entraînait une réponse métabolique différentielle chez les génotypes Adular et Bordeaux (Figures 1, 3, 4 et 5). Pour cela, la comparaison de la réponse métabolique des génotypes à des souches conditionnées et non conditionnées a été réalisée pour chaque interaction souche × génotype. Le génotype Adular répond de façon plus marquée à l'inoculation des souches conditionnées que à l'inoculation des souches non conditionnées (Figure 3 et 4), notamment dans l'interaction Adular × JV395B (Figure 3). Cette interaction différentielle peut être reliée à une augmentation de la production de certains métabolites bioactifs lorsque la souche JV395B est conditionnée, notamment la surproduction de phénazines ou d'AHLs (Figure S1). En effet les AHLs sont des médiateurs pouvant avoir un effet signal inter-règne. Elles sont reconnues par des récepteurs de plante et conduisent à la modification de l'expression de gènes ou la production de protéines (Schenk et al. 2012). L'augmentation de la production d'AHLs chez la souche conditionnée peut également être corrélée à une augmentation de la production de phénazines (Chapitre 2 et 3 ; Morohoshi et al. 2017). En effet la souche JV395B conditionnée avec des extraits produit une quantité plus importante de phénazines, et plus particulièrement des dérivés OH-PHZ et di-OH-PCA. Or, les phénazines sont connues pour être des médiateurs majeurs de l'interaction plante-*Pseudomonas* (Price-Whelan et al. 2006). Elles ont un rôle majeur dans la survie des *P. chlororaphis* dans la rhizosphère du blé et dans la protection de la plante contre les pathogènes à la fois par des activités antagonistes telles que la PCA sur *Botrytis cinerea* ou par induction de la résistance systémique induite (ISR) (Wood et al. 1997, Pierson and Pierson 2010).

L'étude de l'interaction Adular × F113 montre également un gradient de réponses entre l'inoculation de la souche conditionnée et non conditionnée (Figure 4). Pourtant, chez la souche *P. kilonensis* F113, le conditionnement n'entraîne pas l'augmentation de médiateurs connus pour être impliqués dans l'activité phytobénéfique. Au contraire, elle entraîne une diminution de la production de DAPG (Figure S1) qui est le composé majeur responsable de l'activité phytoprotectrice de F113 (Vacheron et al. 2013). Néanmoins, à des concentrations sub-inhibitrices, cette molécule est connue pour avoir un effet signal sur les racines des plantes en modulant certaines voies de biosynthèse (Brazelton et al. 2008). On peut donc imaginer qu'à faible concentration, cette molécule puisse entraîner des modifications métaboliques au

niveau des racines d'Adular. D'un autre côté, le conditionnement de la souche F113 augmente de façon importante la production de composés encore non-étudiés pour leur activité phytobénéfique potentielle tels que les dérivés du PDTC ou encore des dérivés lipophiles azotés (**Figure S1**, chapitre 3). L'augmentation de la réponse de la plante en présence de la souche F113 conditionnée montre ici l'intérêt d'évaluer l'activité biologique de ces composés qui pourraient être impliqués dans les interactions souches × génotypes.

Toutes ces remarques doivent être tempérées par le fait que les modifications métaboliques bactériennes observées étaient effectives lors de l'inoculation des souches mais plus forcément après 21 jours de culture lors de la comparaison des profils métaboliques des plantes. Néanmoins la réponse métabolique de la plante montre qu'un effet différentiel a eu lieu entre l'inoculation des souches conditionnées et non conditionnées (**Figure 3, 4 et 5**). Il est également important de noter que toute cette expérimentation a été réalisée en sol non stérile. Par conséquent, on peut également suggérer que les souches conditionnées ont pu avoir un impact différentiel sur la communauté microbienne rhizosphérique aboutissant à une réponse métabolique spécifique des racines de blé. En effet JV395B est capable de produire les AHLs qui sont les principaux médiateurs du QS (**Venturi and Keel 2016**). Ces médiateurs sont ubiquitaires et peuvent être médiateurs d'interaction entre des bactéries de genres différents (**Flemming et al. 2016**). De nombreuses fonctions biologiques telles que la mobilité, la production de biofilm ou encore la production de composés bioactifs tels que les antimicrobiens sont sous le contrôle du QS chez de nombreux genres bactériens (**Daniels et al. 2004, Elias and Banin 2012**). Nous pouvons donc suggérer que la production importante d'AHLs par JV395B ait pu modifier la physiologie de plusieurs populations bactériennes dans le sol. De plus, bien qu'aucune AHL n'ait été détectée dans le surnageant de culture de la souche F113 (**Chapitre 2, Figure S1**), des études ont montré qu'elle pouvait interagir avec d'autres bactéries phytobénéfiques, telles que la souche *Azospirillum brasilense* Sp245 (**Couillerot et al. 2011 and 2013, Combes-Meynet et al. 2011**). En effet, il a été montré qu'à faibles concentrations, le DAPG pouvait induire la production d'auxine chez Sp245, une souche phytostimulatrice isolée de la rhizosphère du blé (**Combes-Meynet et al. 2011**). Or l'inoculation de souches d'*Azospirillum* sur le maïs montre que ces souches sont également capables d'induire des modifications du métabolisme racinaire du maïs (**Walker et al. 2011; Rozier et al. 2016**).

Ce gradient de réponses n'est pas observé pour le génotype Bordeaux (**Figure 5**). En revanche, la condition BJA (correspondant, pour rappel, au génotype Bordeaux inoculé par JV395B conditionnée par le génotype Adular) est séparée des autres traitements inoculés sur l'axe 2 de l'ACP suggérant une réponse métabolique de la plante légèrement différente lorsque la souche JV395B est conditionnée avec un autre extrait que celui du génotype Bordeaux (**Figure 5**). Cette réponse différentielle lors de l'inoculation d'une souche conditionnée par un autre extrait que celui du génotype inoculé est également retrouvée lors de l'interaction Adular × F113 où la condition AFB est également séparée selon l'axe 2 de l'ACP (**Figure 4**). Ce résultat est surprenant car peu de différences ont pu être mises en évidence entre les métabolismes des souches JV395B ou F113 conditionnées par des extraits de Adular ou Bordeaux (**Figure S1**). Néanmoins, lors de l'étude précédente (**Chapitre 3**) qui évaluait l'impact des extraits sur le métabolisme des souches après 6 jours d'incubation on pouvait voir des différences entre la souche JV395B conditionnée par Bordeaux et celle conditionnée par Adular, notamment au niveau de la voie de biosynthèse des phénazines. On peut se poser la question si dans la rhizosphère, après leur inoculation, il n'y aurait pas une potentielle potentialisation des différences métaboliques entre des souches conditionnées par des extraits différents. On peut également se demander si les génotypes Adular et Bordeaux pourraient être capables de reconnaître différentiellement une souche conditionnée par un autre extrait racinaire que le sien via des signaux non-détectés par les techniques mises en œuvre dans le cadre de cette étude.

Toutes ces informations montrent des modifications métaboliques complexes lorsque la plante est inoculée par les souches F113 et JV395B, d'autant plus lorsque celles-ci sont conditionnées. De nombreux métabolites végétaux dont la production est modifiée sont des composés minoritaires difficiles à identifier. Néanmoins, une approche de réseaux moléculaires nous a permis de mettre en évidence des métabolites discriminants appartenant à des familles de métabolites bioactifs particulières (**Figure 6**). Cette approche a été réalisée sur le génotype Adular sur lequel nous avons pu mettre en évidence une séparation significative entre les traitements après inoculation des souches F113 et JV395B (**Figure 3 et 4**). Le réseau métabolique généré est très proche de celui présenté **chapitre 3**. Il représente majoritairement trois grandes familles de molécules bioactives, les acides hydroxycinnamiques (HCAs), les acides hydroxycinnamique amides (HCAAs), les benzoxazinoïdes et les flavonoïdes. Des composés

discriminants ont pu être mis en évidence dans ces trois familles de métabolites secondaires. Ces trois familles de molécules représentent la majorité des métabolites actifs chez le blé (Wu et al. 2001).

Les acide hydroxycinnamiques sont issus du métabolisme des phénylpropanoïdes. Le précurseur de cette voie est la phénylalanine qui est modifiée par la phénylalanine ammonia lyase (PAL) pour donner l'acide cinnamique et par la suite d'autres dérivés tels que l'acide coumarique, caféique ou férulique (Vanholme et al. 2019). Ces dérivés servent ensuite de précurseurs à la formation d'autres composés tels que les HCAAs ou les flavonoïdes. La diminution de la production de la phénylalanine dans les racines de blé après inoculation des souches et plus particulièrement de JV395B conditionnée peut s'expliquer par une augmentation de sa transformation au sein des voies du métabolisme des phénylpropanoïdes (Vanholme et al. 2019).

Les HCAAs sont issus d'une condensation entre un HCA et une polyamine aliphatique ou aromatique (Macoy et al. 2015). Ce sont des métabolites courants dans le monde végétal. Ils sont impliqués dans plusieurs processus physiologiques végétaux tels que la sénescence ou la floraison (Macoy et al. 2015). Ces composés sont également impliqués dans la réponse de la plante contre des stress biotiques et abiotiques tels que le froid ou les attaques de pathogènes (Häusler et al. 2014, Jin et al. 2003). La production de p-coumaroyldopamine et féruloyldopamine est par exemple augmentée après infection de la tomate par *Pseudomonas syringae* (Zacares et al. 2007). Une autre étude évaluant la réponse métabolique du blé a également mis en évidence que l'inoculation du pathogène *Bipolaris sorokiniana* entraînait une augmentation de 14 HCAAs dans les feuilles de blé (Ube et al. 2019). Des concentrations importantes ont pu être notées pour les dérivés coumariques tels que la coumaroyl-agsmatine ou la coumaroyl-hydroxyputrescine. Au vu de ces résultats, les auteurs suggèrent un rôle important des HCAAs dans la défense du blé contre *B. sorokiniana* et suggèrent une fonction phytoalexine chez le blé, au même titre que les benzoxazinoïdes (Ube et al. 2019). Une autre étude a également pu montrer une augmentation de la production des HCAAs dans les racines de riz, mais cette fois en présence de bactéries phytobénéfiques (Valette et al. 2019). Cette étude montre une augmentation de plusieurs HCAAs tels que la p-coumaroyl putrescine ou la féruloyl-putrescine en présence de 10 souches phytobénéfiques, mais une diminution en présence de la souche pathogène *Burkholderia glumae* AU6208 (Valette et al. 2019). Les

résultats obtenus dans notre étude sont relativement contrastés avec une augmentation de la sinapoyl-agmatine et une diminution de la coumaroyl-cadaverine par les souches F113 et JV395B, avec des différences selon si les souches sont conditionnées ou pas. L'impact de la souche JV395B sur la production des dérivés HCAAs est par exemple plus importante lorsqu'elle est conditionnée (**Figure 6**). Tous ces résultats montrent que les HCAAs jouent probablement un rôle important dans les interactions plante-micro-organismes. Néanmoins notre étude associée aux données de la littérature montre le nombre très important de dérivés qui peuvent être détectés dans les extraits racinaires de blé et la diversité des activités de ces molécules (**Figure 6**).

Une autre famille de métabolites dérivant des HCAs sont les flavonoïdes par une voie mixte de biogénèse ([Vanholme et al. 2019](#)). Les flavonoïdes sont également une famille de métabolites secondaire très représentés dans le monde végétal ([Weston et Mathesius 2013](#)). C'est une famille diversifiée qui contient plus de 5000 structures différentes ([Wojakowska et al. 2013](#)). Plusieurs ont pu être détectés chez le blé, notamment le schaftoside (Apigénine-6-C-arabinoside-8-C-hexoside) qui est un des composés majoritaires ([Dinelli et al. 2011](#)). Les flavonoïdes sont des composés fortement étudiés dans les interactions plante-bactérie notamment dans le cadre des symbioses mutualistes *Rhizobium*-légumineuse ou la symbiose actinorhizienne ([Weston and Mathesius 2013](#)). Ils présentent aussi des activités antimicrobiennes ([Shaw et al. 2006](#)) et une activité sur les bactéries rhizosphériques ([Webster 1998](#), [Vandeputte et al. 2011](#), [Grandclément et al. 2016](#)). Deux isomères du schaftoside ont été détectés dans les extraits racinaires, probablement le schaftoside et l'isoschaftoside (**Figure 6**). Ces deux dérivés ont tendance à être diminués suite à l'inoculation des souches F113 et JV395B. Cette diminution est particulièrement importante pour le schaftoside I lorsque la souche JV395B est conditionnée (**Figure 6**). L'activité des flavonoïdes sur les souches bactériennes peut présenter des spécificités en fonction des souches et du composé ([Webster et al. 1998](#)). A notre connaissance, aucune étude n'a évalué spécifiquement l'impact du schaftoside sur des souches de *Pseudomonas*. En revanche certains flavonoïdes tels que la naringénine peuvent interférer avec le QS chez certaines souches bactériennes ([Grandclément et al. 2016](#)). Nous pouvons poser l'hypothèse que la souche JV395B conditionnée, dont la production d'AHLs est plus importante, puisse interférer avec la production de la flavonoïdes ([Grandclément et al. 2016](#)). Il est également important de noter que les voies de biosynthèse des métabolites secondaires

sont étroitement corrélées les unes des autres (Sanchez et Demain 2019). La production de flavonoïdes est par exemple modifiée chez des génotypes de maïs délétés dans la voie de production des benzoxazinoïdes (Cotton et al. 2019). On peut donc poser l'hypothèse que la diminution du schaftoside ne soit pas due à un impact de l'inoculation mais résulte de la modification de la production d'autres métabolites (Cotton et al. 2019).

Les benzoxazinoïdes représentent la famille de molécules contenant le plus de composés discriminants. Ces métabolites secondaires végétaux sont retrouvés chez les *Poaceae* et certaines autres familles de plantes (Zhou et al. 2018). Ils sont particulièrement étudiés chez le blé, le maïs et l'orge chez qui ils sont produits lors des premiers stades de croissance de la plante (Neal et al. 2012, Glauser et al. 2011). Ils sont décrits comme une des principales classes de phytoalexines chez les *Poaceae* (Ube et al. 2019), notamment dans la protection des jeunes plantes contre les attaques d'insectes et de pathogènes (Hu et al. 2018, Marti et al. 2013). De façon intéressante, il a été montré que les benzoxazinoïdes n'avaient pas le même impact sur tous micro-organismes (Neal et al. 2012, Hu et al. 2018, Cotton et al. 2019). Le DIMBOA peut, par exemple, avoir un effet toxique sur une souche pathogène du genre *Agrobacterium*, et un effet phytoattractant sur une souche *Pseudomonas putida* avec également un effet inducteur sur l'activité phytoprotectrice de cette dernière (Neal et al. 2012, Neal et Ton 2013). La comparaison des rhizomicrobiotes d'un maïs sauvage et d'un génotype BX⁻ incapable de produire des benzoxazinoïdes a également montré que les deux génotypes ne recrutaient pas la même communauté rhizosphérique (Hu et al. 2018, Cotton et al. 2019). De façon intéressante, le microbiote sélectionné par le génotype capable de produire des benzoxazinoïdes exerce un effet protecteur sur les plantes de la génération suivante, ce qui n'est pas le cas du rhizomicrobiote sélectionné par génotypes BX⁻ (Hu et al. 2018). Ces travaux montrent le rôle des benzoxazinoïdes dans l'interaction du maïs avec son rhizomicrobiote et un rôle de sélection de micro-organismes capables de protéger les plantes (Hu et al. 2018).

La voie de biosynthèse des benzoxazinoïdes part du tryptophane et donne lieu à plusieurs dérivés glycosylés et non glycosylés (Zhou et al. 2018). Dans notre étude l'inoculation des souches F113 et JV395B sur le génotype Adular a tendance à entraîner une diminution des dérivés glycosylés (i.e. DHBOA-Glc, DIBOA-Glc, HMBOA-Glc, DIMBOA-Glc) qui est significative après inoculation de la souche JV395B conditionnée. Les dérivés glycosylés sont considérés

comme des formes de stockage contenues dans la vacuole des cellules végétales (Wouters et al. 2016). En cas de dégradation des tissus, ils sont déversés dans le milieu extérieur et sont activés par des β -galactosidases ce qui donne lieu aux formes aglycones, plus actives (Wouters et al. 2016). L'inoculation de JV395B conditionnée induit une augmentation de la production de HDMBOA et une forte tendance à l'augmentation du MBOA (test univarié, p -value = 0,12). Chez la souche F113, le HDMBOA est augmenté seulement dans la condition AFA et le MBOA après inoculation des deux souches conditionnées. On peut noter que l'HDMBOA est la forme aglycone qui se transforme le plus rapidement en MBOA (Wouters et al. 2016). Les dérivés aglycones et le MBOA sont référencés dans certaines études comme les formes les plus actives des benzoxazinoïdes (Hu et al. 2018). Le MBOA seul peut par exemple conditionner le microbiote du maïs et entraîner en retour un effet protecteur sur la prochaine génération de plante (Hu et al. 2018). Cette modification de la balance entre les formes glycosylées et aglycones, ainsi que l'augmentation du MBOA suite à l'inoculation des souches et plus particulièrement des souches conditionnées peut donc avoir un effet important sur la physiologie des géotypes et leurs interaction biotiques avec le rhizomicrobiote.

Les résultats de cette étude ont montré que les souches entraînaient des réponses métaboliques spécifiques sur chacun des deux géotypes de blé suggérant une spécificité d'interaction. Ils ont également mis en évidence que les géotypes de blé réagissaient différemment à l'inoculation des souches conditionnées et non conditionnées. Ces résultats suggèrent que la plante reconnaisse différemment les bactéries avec lesquelles elle a déjà été en contact. Ces travaux doivent être approfondis pour comprendre les éléments impliqués dans cette reconnaissance différentielle. Ils démontrent néanmoins l'importance de l'impact que peut avoir la plante hôte sur la physiologie des PGPR et mettent en évidence de nouvelles pistes à prendre en compte dans la préparation des *inocula* bactériens en agriculture.

Références

- Bais HP, Weir TL, Perry LG, Gilroy S, & Vivanco, JM. 2006. The role of root exudates in rhizosphere interactions with plants and other organisms. *Annual Review of Plant Biology* **57**: 233–266.
- Brazelton J N, Pfeufer E E, Sweat T A, Gardener B B M, & Coenen C. 2008. 2,4-Diacetylphloroglucinol Alters Plant Root Development. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, **21**: 1349–1358.
- Caraux G. & Pinloche S. 2005. PermutMatrix: A graphical environment to arrange gene expression profiles in optimal linear order. *Bioinformatics*, **21**: 1280–1281.
- Combes-Meynet E, Pothier J F, Moëgne-Loccoz Y, & Prigent-Combaret C. 2011. The *Pseudomonas* secondary metabolite 2,4-diacetylphloroglucinol is a signal inducing rhizoplane expression of *Azospirillum* genes involved in plant-growth promotion. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, **24**: 271–284.
- Cotton T E A, Pétriacq P, Cameron D D, Meselmani M Al, Schwarzenbacher R, Rolfe S A & Ton J. 2019. Metabolic regulation of the maize rhizobiome by benzoxazinoids. *ISME Journal*, **13**: 1647–1658.
- Couillerot O, Combes-Meynet E, Pothier J F, Bellvert F, Challita E, Poirier M A, Prigent-Combaret C. 2011. The role of the antimicrobial compound 2,4-diacetylphloroglucinol in the impact of biocontrol *Pseudomonas fluorescens* F113 on *Azospirillum brasilense* phytostimulators. *Microbiology*, **157**: 1694–1705.
- Daniels R, Vanderleyden J & Michiels J. 2004. Quorum sensing and swarming migration in bacteria. *FEMS Microbiology Reviews*, **28**: 261–289.
- De Mendiburu F & Simon R. 2015. Agricolae - Ten years of an open source statistical tool for experiments in breeding, agriculture and biology. *PeerJ*, **3**: 0–17.
- Dinelli G, Segura-Carretero A, Di Silvestro R, Marotti I, Arráez-Román D, Benedettelli S, Fernandez-Gutierrez A. 2011. Profiles of phenolic compounds in modern and old common wheat varieties determined by liquid chromatography coupled with time-of-flight mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, **1218**: 7670–7681.
- Elias S & Banin E. 2012. Multi-species biofilms: Living with friendly neighbours. *FEMS Microbiology Reviews*, **36**: 990–1004.
- Flemming H-C, Wingender J, Szewzyk U, Steinberg P, Rice S A, & Kjelleberg S. 2016. Biofilms: an emergent form of bacterial life. *Nature Reviews Microbiology*, **14**: 563–575.
- Glauser G, Marti G, Villard N, Doyen G A, Wolfender J L, Turlings T C J, & Erb M. 2011 Induction and detoxification of maize 1,4-benzoxazin-3-ones by insect herbivores. *Plant Journal*, **68**: 901–911.
- Grandclément C, Tannières M, Moréra S, Dessaux Y & Faure D. 2015. Quorum quenching: Role in nature and applied developments. *FEMS Microbiology Reviews*, **40**: 86–116.
- Häusler R E, Ludewig F & Krueger S. 2014. Amino acids - A life between metabolism and signaling. *Plant Science*, **229**: 225–237.

- Hu L, Robert C A M, Cadot S, Zhang X, Ye M, Li B, Erb M. 2018. Root exudate metabolites drive plant-soil feedbacks on growth and defense by shaping the rhizosphere microbiota. *Nature Communications* **9**: 1–13.
- Jin S, Yoshida M, Nakajima T & Murai A. 2003. Accumulation of hydroxycinnamic acid amides in winter wheat under Snow. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, **67**: 1245–1249.
- Lemanceau P, Blouin M, Muller D & Moëgne-Loccoz Y. 2017. Let the Core Microbiota Be Functional. *Trends in Plant Science*, **22**: 583–595.
- Macoy D M, Kim W Y, Lee S Y & Kim M G. 2015. Biosynthesis, physiology, and functions of hydroxycinnamic acid amides in plants. *Plant Biotechnology Reports*, **9**: 269–278.
- Marti G, Erb M, Boccard J, Glauser G, Doyen G R, Villard N, Wolfender J L. 2013. Metabolomics reveals herbivore-induced metabolites of resistance and susceptibility in maize leaves and roots. *Plant, Cell and Environment*, **36**: 621–639
- Mathesius U, Mulders S, Gao M, Teplitski M, Caetano-Anolles G, Rolfe B G & Bauer W D. 2003. Extensive and specific responses of a eukaryote to bacterial quorum-sensing signals. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **100**: 1444–1449.
- Mazzola M, Cook R J, Thomashow L S, Weller D M & Pierson L S. 1992. Contribution of phenazine antibiotic biosynthesis to the ecological competence of fluorescent pseudomonads in soil habitats. *Applied and Environmental Microbiology*, **58**: 2616–2624.
- Morohoshi, T., Yamaguchi, T., Xie, X., Wang, W., Takeuchi, K., and Someya, N. 2017. Complete Genome Sequence of *Pseudomonas chlororaphis* subsp. *Aurantiaca* reveals a triplicate quorum-sensing mechanism for regulation of phenazine production. *Microbes and environment* **32**: 47–53.
- Neal A L, Ahmad S, Gordon-Weeks R & Ton J. 2012. Benzoxazinoids in root exudates of maize attract *Pseudomonas putida* to the rhizosphere. *PLoS ONE*, **7**(4).
- Neal A L & Ton J. 2013. Systemic defense priming by *Pseudomonas putida* KT2440 in maize depends on benzoxazinoid exudation from the roots. *Plant Signaling and Behavior*, **8**: 120–124.
- Olivon, F., Elie, N., Grelier, G., Roussi, F., Litaudon, M., & Touboul, D. 2018. MetGem Software for the Generation of Molecular Networks Based on the t-SNE Algorithm. *Analytical Chemistry*, **90**: 13900–13908.
- Philippot L, Raaijmakers J M, Lemanceau P & van der Putten W H. 2013. Going back to the roots: the microbial ecology of the rhizosphere. *Nature Reviews Microbiology*, **11**: 789–799.
- Pierson S. L & Pierson A E. 2010. Metabolism and function of phenazines in bacteria: impacts on the behavior of bacteria in the environment and biotechnological processes. **86**: 1659–1670.
- Price-Whelan A, Dietrich L E P & Newman D K. 2006. Rethinking “secondary” metabolism: physiological roles for phenazine antibiotics. *Nature Chemical Biology*, **2**: 71–78.
- Rozier, C., Erban, A., Hamzaoui, J., Prigent-Combaret, C. Comte, G ... and Legendre L. 2016. Xylem sap metabolite profile changes during phytostimulation of maize by the plant growth-promoting rhizobacterium, *Azospirillum lipoferum* CRT1. *Metabolomics* **6**: 2153–0769.

- Sanchez S & Demain A L. 2019. Secondary metabolites. *Comprehensive Biotechnology*, 131–143.
- Schenk P M, Carvalhais L C & Kazan K. 2012. Unraveling plant-microbe interactions: Can multi-species transcriptomics help? *Trends in Biotechnology*, **30**: 177–184.
- Selin, C., Habibian, R., Poritsanos, N., Athukorala, S.N.P., Fernando, D., and De Kievit, T.R. 2010. Phenazines are not essential for *Pseudomonas chlororaphis* PA23 biocontrol of *Sclerotinia sclerotiorum* but do play a role in biofilm formation. *FEMS Microbiology Ecology* **71**: 73–83
- Shanahan P, Sullivan D J O, Simpson P & Jeremy D 1992. Production Isolation of 2, 4-Diacetylphloroglucinol from a Fluorescent Pseudomonad and Investigation of Physiological Parameters Influencing Its Production. *Applied and Environmental Microbiology*, **58**: 0–5.
- Shaw L J, Morris P & Hooker J E. 2006. Perception and modification of plant flavonoid signals by rhizosphere microorganisms. *Environmental Microbiology*, **8**: 1867–1880.
- Souard F, Delporte C, Stoffelen P, Thévenot E A, Noret N, Dauvergne B, ... Stévigny C. 2018. Metabolomics fingerprint of coffee species determined by untargeted-profiling study using LC-HRMS. *Food Chemistry*, **245**: 603–612.
- Thévenot E A, Roux A, Xu Y, Ezan E & Junot C. 2015. Analysis of the Human Adult Urinary Metabolome Variations with Age, Body Mass Index, and Gender by Implementing a Comprehensive Workflow for Univariate and OPLS Statistical Analyses. *Journal of Proteome Research*, **14**: 3322–3335.
- Thioulouse J, Chessel D, Dolédec F and Olivier JM. 1997. ADE-4: a multivariate analysis and graphical display software. *Statistics and Computing* **7**: 75-83.
- Ube N, Harada D, Katsuyama Y, Osaki-Oka K, Tonooka T, Ueno K, ... Ishihara A. 2019. Identification of phenylamide phytoalexins and characterization of inducible phenylamide metabolism in wheat. *Phytochemistry*, **167**: 112098.
- Vacheron J, Desbrosses G, Bouffaud M L, Touraine B, Moëgne-Loccoz Y, Muller D, Prigent-Combaret, C. 2013. Plant growth-promoting rhizobacteria and root system functioning. *Frontiers in Plant Science*, **4**: 356.
- Vacheron J, Moëgne-Loccoz Y, Dubost A, Gonçalves-Martins M, Muller D & Prigent-Combaret C. 2016. Fluorescent *pseudomonas* strains with only few plant-beneficial properties are favoured in the maize rhizosphere. *Frontiers in Plant Science*, **7**: 1–13.
- Valente J, Gerin F, Le Gouis J, Moëgne-Loccoz Y & Prigent-Combaret C. 2020. Ancient wheat varieties have a higher ability to interact with plant growth-promoting rhizobacteria. *Plant Cell and Environment*, **43**: 246–260.
- Valette M, Rey M, Gerin F, Comte G & Wisniewski-Dyé F 2020. A common metabolomic signature is observed upon inoculation of rice roots with various rhizobacteria. *Journal of Integrative Plant Biology*, **62** 228-246
- Vandeputte OM, Kiendrebeogo M, Rasamiravaka T, Stévigny C, Duez P, Rajaonson S, ... el Jaziri M. 2011. The flavanone naringenin reduces the production of quorum sensing-controlled virulence factors in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. *Microbiology*, **157**: 2120–2132.

- Vanholme R, De Meester B, Ralph J & Boerjan W. 2019. Lignin biosynthesis and its integration into metabolism. *Current Opinion in Biotechnology*, **56**: 230–239.
- Venturi V & Keel C. 2016. Signaling in the Rhizosphere. *Trends in Plant Science*, **21**: 187–198.
- Walker V, Bertrand C, Bellvert F, Moëgne-Loccoz Y, Bally R & Comte G. 2011. Host plant secondary metabolite profiling shows a complex, strain-dependent response of maize to plant growth-promoting rhizobacteria of the genus *Azospirillum*. *New Phytologist*, **189**: 494–506.
- Webster G, Jain V, Davey MR, Gough C, Vasse J, Dénarié J & Cocking EC. 1998. The flavonoid naringenin stimulates the intercellular colonization of wheat roots by *Azorhizobium caulinodans*. *Plant, Cell and Environment*, **21**: 373–383.
- Weston LA & Mathesius U. 2013. Flavonoids: Their Structure, Biosynthesis and Role in the Rhizosphere, Including Allelopathy. *Journal of Chemical Ecology*, **39**: 283–297.
- Wojakowska A, Perkowski J, Góral T & Stobiecki M. 2013. Structural characterization of flavonoid glycosides from leaves of wheat (*Triticum aestivum* L.) using LC/MS/MS profiling of the target compounds. *Journal of Mass Spectrometry*, **48**: 329–339.
- Wood D W, Gong F, Daykin M M, Williams P & Pierson L S. 1997. N-Acyl-homoserine lactone-mediated regulation of phenazine gene expression by *Pseudomonas aureofaciens* 30-84 in the wheat rhizosphere. *Journal of Bacteriology*, **179**: 7663–7670.
- Wouters F C, Gershenzon J & Vassão D G. 2016. Benzoxazinoids: Reactivity and modes of action of a versatile class of plant chemical defenses. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, **27**: 1379–1397.
- Wu H, Haig T, Pratley J, Lemerle D & An M. 2001. Allelochemicals in wheat (*Triticum aestivum* L.): Cultivar difference in the exudation of phenolic acids. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **49**: 3742–3745.
- Zacarés L, López-Gresa M P, Fayos J, Primo J, Bellés J M & Conejero V. 2007. Induction of p-coumaroyldopamine and feruloyldopamine, two novel metabolites, in tomato by the bacterial pathogen *Pseudomonas syringae*. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, **20**: 1439–1448.
- Zhou S, Richter A & Jander G. 2018. Beyond defense: Multiple functions of benzoxazinoids in maize metabolism. *Plant and Cell Physiology*, **59**: 1528–1533.

Données supplémentaires

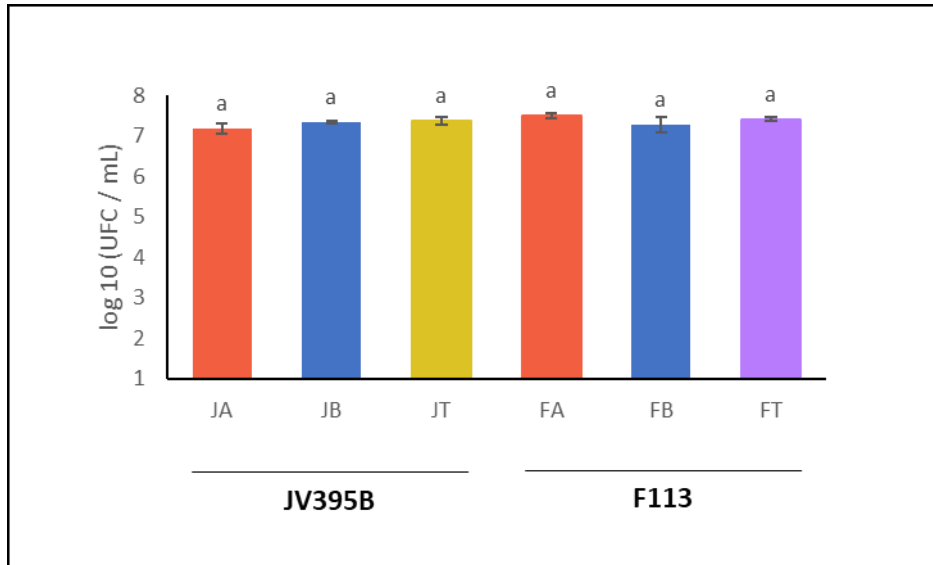


Figure S2 : Quantification de la population bactérienne de chaque inoculum avant inoculation sur les graines des géotypes Adular et Bordeaux. Des tests statistiques paramétriques univariés de comparaison de moyenne (Anova et Tuckey, P value < 0,05) n'ont pas permis de mettre en évidence de différences significatives entre les conditions.

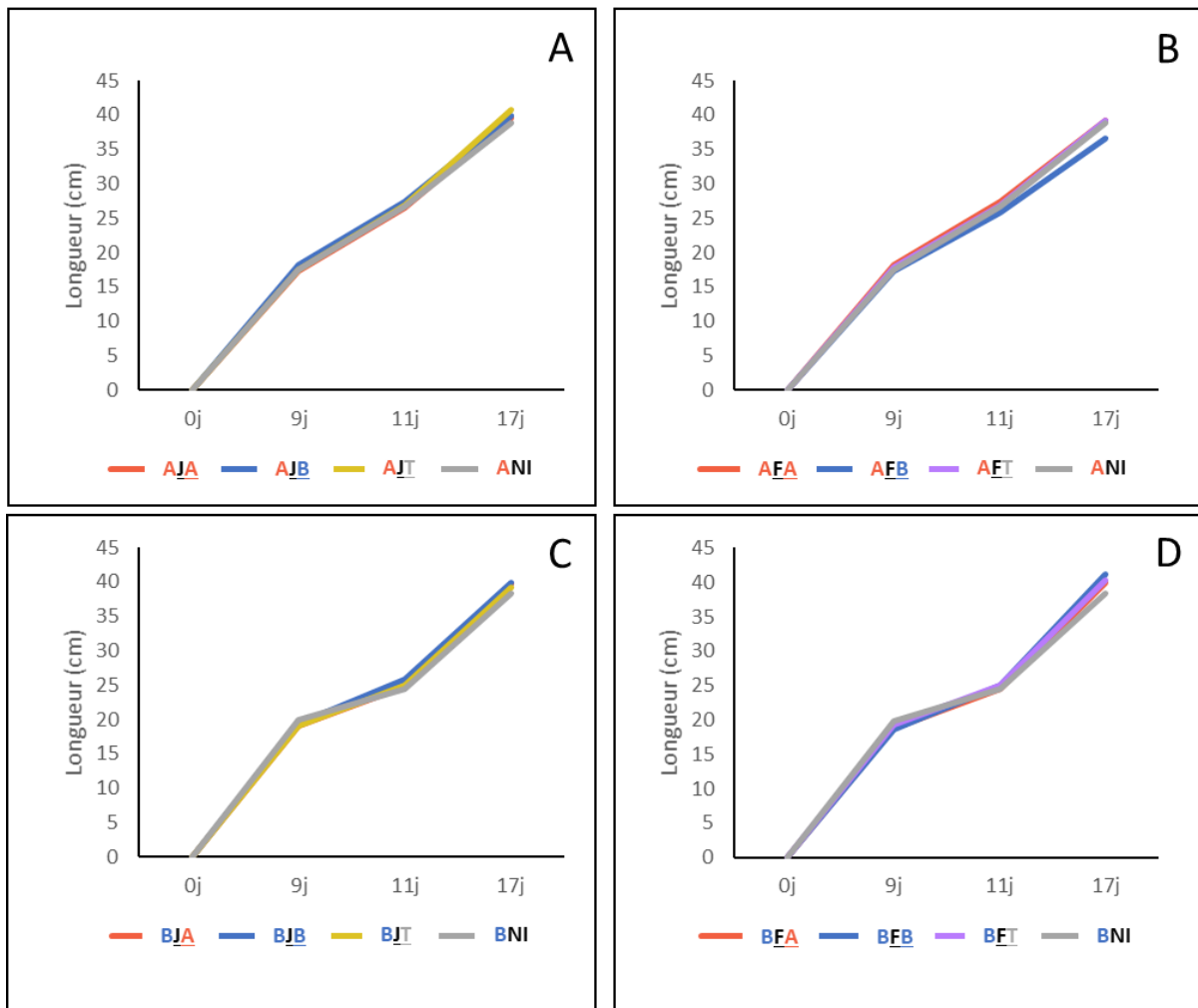


Figure S3 : Impact de l'inoculation de la souche JV395B conditionnée et non conditionnée sur la croissance des parties aériennes du génotype Adular (A) et du génotype Bordeaux (C). Impact de l'inoculation de la souche F113 conditionnée et non conditionnée sur la croissance des parties aériennes du génotype Adular (B) et du génotype Bordeaux (D). Des tests statistiques paramétriques univariés de comparaison de moyenne (Annova et Tuckey, P value < 0,05) n'ont pas permis de mettre en évidence de différences significatives entre les conditions.

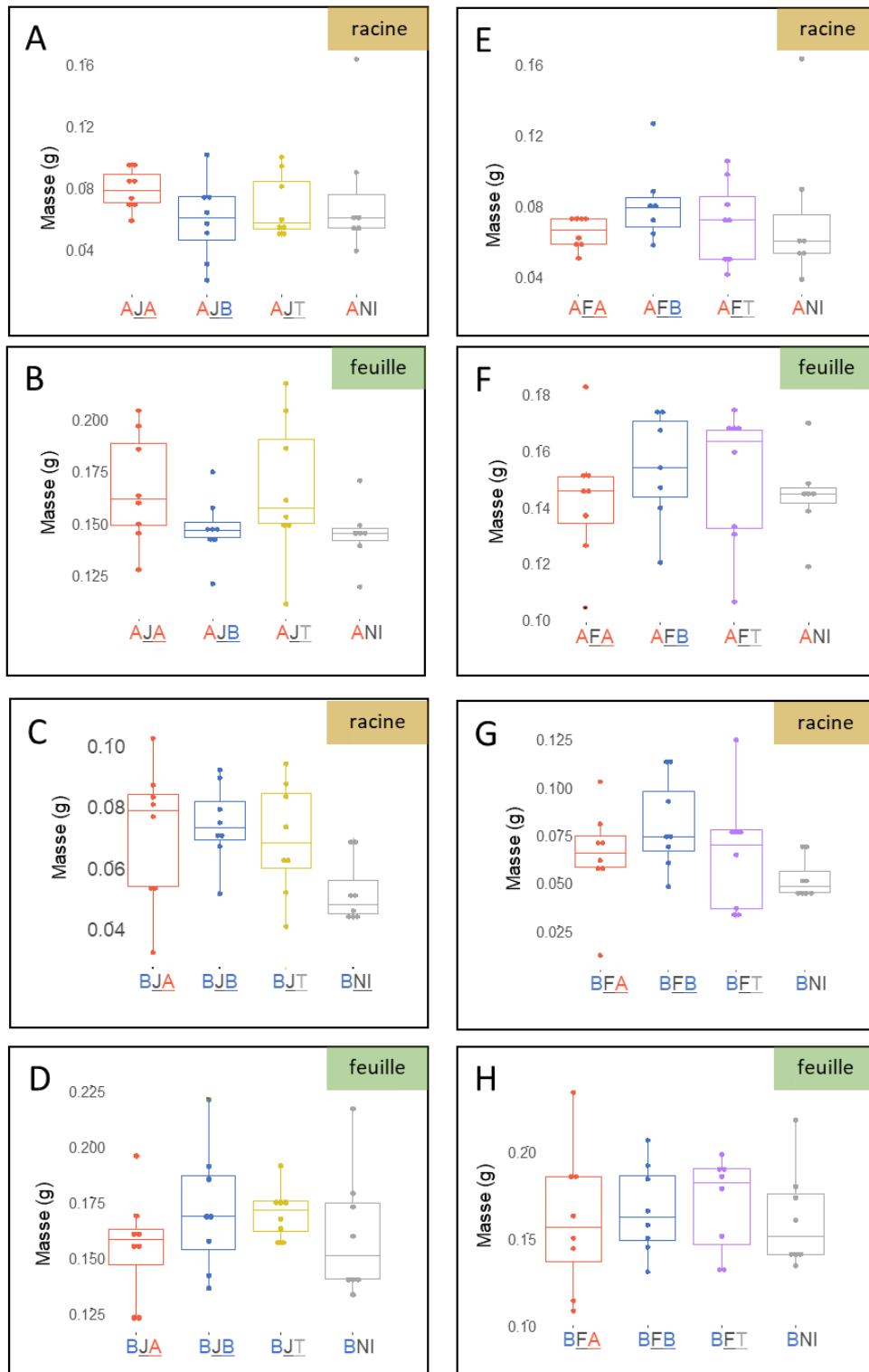


Figure S4 : Impact de l'inoculation de la souche JV395B conditionnée et non conditionnée sur les biomasses sèches des racines et des feuilles du génotype Adular (AB) et du génotype Bordeaux (CD). Impact de l'inoculation de la souche F113 conditionnée et non conditionnée sur les biomasses sèches des racines et des feuilles du génotype Adular (EF) et du génotype Bordeaux (GH). Des tests statistiques paramétriques univariés de comparaison de moyenne (Anova et Tuckey, P value < 0,05) n'ont pas permis de mettre en évidence de différences significatives entre les conditions.

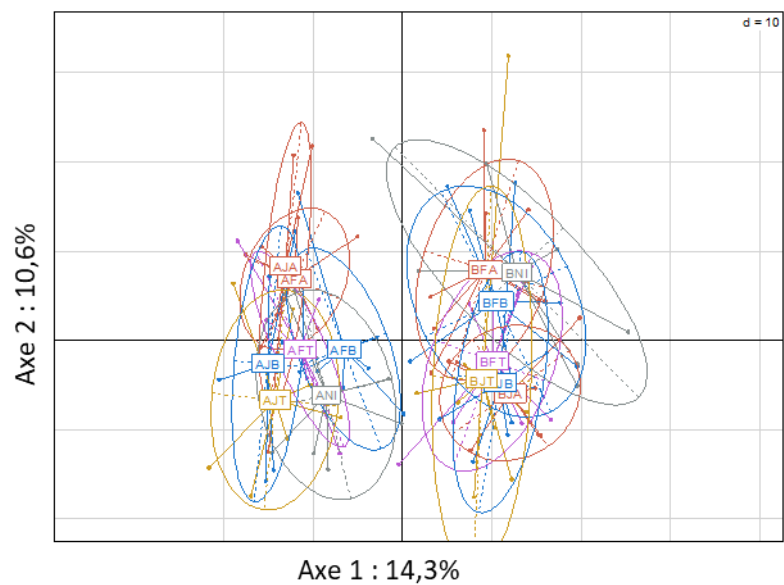


Figure S5 : Analyse à composante principale (ACP) réalisée sur toutes les conditions de l'expérience. L'ACP a été réalisée sur les intensités relatives des ions (1059 variables) appartenant à un total de 98 échantillons (14 conditions ; n = 7). La séparation des variables selon l'axe 1 qui représente 14,3% de la variabilité sépare les métabolomes des échantillons du génotypes Adular de ceux du génotype Bordeaux.

Table S1. Parameter settings used for metabolomics data processing of *Pseudomonas* extract and wheat root samples

Step	Method	Parameters	Values wheat root samples	Values <i>Pseudomonas</i> strains culture samples
Peak detection (Peakpicking)^a	centWave	ppm	10	10
		mzdiff	0.05	0.05
		prefilter	3, 2500	3, 5000
		snthresh	10	10
		peakwidth	4, 15	4, 15
		noise	5000	10000
Peak grouping (group)^a	density	bw	4	3
		mzwid	0.25	0.25
		minfrac	0.05	0.01
FillPeaks	chrom			

^a data processed with xcms R-package on collaborative Galaxy platform "Workflow4metabolomics" version 3.3

Table S2. Molecular networking: MZmine 2 data-preprocessing parameters

Steps	Methods	Parameters	Values
Mass detection		Noise level MS1	0
		Noise level MS2	0
chromatogram builder	ADAP	Minimum group size of scan	4
		Group intensity threshold	3000
		Minimum highest intensity	4000
		m/z tolerance	0.005 (20 ppm)
Deconvolution	ADAP Wavelets algorithm	S/N threshold	8
		Minimum feature height	4000
		Coefficient/area threshold	20
		Peak duration range	0.05 – 1 min
		T _R wavelet range	0.01 – 0.07 min
MS2 scans paired		m/z tolerance	0.02 Da
		t _R tolerance	0.3 min
Isotopologue grouping	Isotopic peak grouper algorithm	m/z tolerance	0.005 (20 ppm)
		t _R tolerance	0.2 min
Filtering	Feature list rows filter	Retention time range	1 – 14 min
		Keep only peaks with MS2 scan	
Peak alignment	Join aligner module	m/z tolerance	0.005 (20 ppm)
		Weight for m/z	2
		t _R tolerance	0.5 min
Gap filled		Weight for t _R	1
		m/z tolerance	0.005 (20 ppm)
		t _R tolerance	0.5 min

Chapitre 5 : Discussion et perspectives

Au cours de ce travail de thèse, nous nous sommes intéressés aux interactions entre une plante hôte et des bactéries phytobénéfiques présentes au sein de son rhizomicrobiote, les PGPR. L'impact des PGPR sur la santé de la plante est de plus en plus étudié, particulièrement dans une démarche appliquée, afin de les utiliser pour favoriser la croissance ou la résistance de la plante contre les maladies. De plus en plus d'étude ont mis en évidence l'impact de la plante sur la formation de la communauté rhizosphérique et l'impact des métabolites racinaires sur la sélection des taxa microbiens (Cotton et al. 2019, Voges et al. 2019, Stringlis et al. 2018, Huang et al. 2019). En revanche l'impact des médiateurs racinaires sur la physiologie dont le métabolisme secondaire des PGPR est encore relativement peu étudié. La métabolomique est définie par l'analyse non ciblée de l'ensemble des métabolites produits par un organisme. Elle arrive au 4^{ème} niveau de caractérisation des systèmes biologiques après la génomique, la transcriptomique et la protéomique. Elle permet de réaliser une visualisation précise de l'état d'un organisme en lien avec son environnement. L'utilisation de cette approche dans l'étude des interactions plante-bactéries peut ainsi contribuer à une meilleure compréhension des modifications physiologiques induites chez chacun des deux partenaires. Ces travaux de thèse ont appliqué la métabolomique à l'étude des interactions entre le blé tendre (*Triticum aestivum* L.) et des bactéries rhizosphériques du genre *Pseudomonas*. Ils avaient pour double objectif d'évaluer l'impact des interactions sur la physiologie des organismes et de mettre en évidence des médiateurs chimiques de l'interaction blé-*Pseudomonas*. L'originalité de notre étude résidait dans l'utilisation d'une approche de métabolomique croisée, pour étudier à la fois, l'impact de la plante sur le métabolome bactérien, et les conséquences de cette modification sur le métabolome de la plante. La première étape a concerné la préparation d'extraits végétaux de blé, leur caractérisation métabolique puis l'analyse de leurs effets sur le métabolome des *Pseudomonas*.

Stratégie d'extraction des métabolites végétaux médiateurs de l'interaction blé-*Pseudomonas*

Pour la première étape qui visait à extraire et caractériser les métabolites secondaires végétaux dont l'activité biologique a par la suite été testée sur les souches de *Pseudomonas*, nous avons choisi de cultiver les géotypes de blé dans un sol non stérile, afin d'être plus proche des conditions naturelles. Nous avons également fait le choix de travailler sur les extraits racinaires

de blé et non sur les exsudats, et cela, pour plusieurs raisons. Premièrement, l'exsudation dépend de nombreux paramètres tels que de l'architecture racinaire, le pH, la salinité ou encore les micro-organismes du sol, ce qui conduit à une très importante variabilité entre les échantillons (Walker et al. 2011, van Dam et al. 2016). Deuxièmement, l'extraction des exsudats à partir de sol rhizosphérique, ne permet d'obtenir que de très faibles quantités de métabolites et n'était pas compatible avec l'analyse de l'activité biologique des extraits (Oburger et al. 2015). Il est néanmoins important de noter que plusieurs familles de métabolites détectés dans les extraits racinaires de blé, à savoir les HCA, les HCAA, les flavonoïdes ou encore les benzoxazinoïdes peuvent être exsudés dans la rhizosphère et ont été détectés dans d'autres études réalisées sur des exsudats végétaux (van Dam et al. 2016, Walker et al. 2011, Zhou et al. 2018).

La deuxième limite de l'expérimentation repose sur le fait que les métabolites racinaires ont été extraits avant d'être mis en contact des *Pseudomonas*. Aucune méthode d'extraction ne permet d'extraire tous les métabolites produits par un organisme (Wolfender et al. 2015). Dans notre étude, nous avons choisi d'extraire les métabolites racinaires par du méthanol car ce solvant de polarité moyenne permet l'extraction d'un très large panel de molécules et particulièrement des métabolites secondaires phénoliques. Il est par ailleurs très souvent utilisé dans les études de métabolomique du fait de sa très grande capacité de solvatisation de composés variés (Wolfender et al. 2015). Néanmoins, nous sommes conscients que nous n'avons pas extraits tous les métabolites racinaires des trois génotypes de blé et que l'activité de composés volatiles tels que les terpènes ou certains acides gras n'a, par exemple, pas pu être intégrée dans cette l'étude.

Le protocole expérimental utilisé nous a permis de faire une caractérisation métabolique des métabolites racinaires de blé et de mettre en évidence plusieurs familles de métabolites d'importance majeure dans les interactions biotiques (i.e. HCA, HCAA, flavonoïdes, benzoxazinoïdes). Notre approche a également permis de mettre en évidence des différences quantitatives de production de ces métabolites en fonction des génotypes de blé (**Chapitre 3**).

Le métabolisme secondaire des *Pseudomonas* est dépendant du mode de vie bactérien

Avant d'analyser l'impact des métabolites de plante sur la physiologie des *Pseudomonas*, il a été nécessaire en 1^{er} lieu de caractériser le métabolisme secondaire des cinq souches de *Pseudomonas* étudiées. Le séquençage des génomes associé à la recherche des gènes impliqués dans la production de métabolites secondaires a, dans un premier temps, permis d'évaluer les capacités métaboliques des souches (**Chapitre 2**). Nous avons ensuite extrait et analysé les métabolites produits par les souches cultivées en mode biofilm et en mode planctonique. Le biofilm est directement associé au phénomène de colonisation racinaire des souches sur les racines de plantes et constitue donc le mode de vie préférentiel des bactéries dans le rhizomicrobiote (Pandin et al. 2017). Il est donc important d'évaluer l'impact de ce mode de vie sur le métabolisme secondaire des souches et de mettre en évidence les métabolites dont la production est augmentée en mode biofilm.

L'analyse non ciblée du métabolisme des souches nous a permis de montrer que, le mode de vie bactérien constitue un facteur majeur influençant la production de métabolites secondaires chez les souches de *Pseudomonas* étudiées. Nous avons également pu mettre en évidence que la majorité des métabolites secondaires impliqués dans les interactions biotiques sont surproduits en mode biofilm particulièrement chez les souches de *P. chlororaphis* et *P. koreensis*. Une approche ciblée a également montré que le mode de vie pouvait particulièrement influencer la production de métabolites impliqués dans l'activité phytobénéfique des souches. Les phénazines et les AHLs sont par exemple les composés dont la production est la plus impactée par le mode de vie en biofilm chez les souches de *Pseudomonas chlororaphis* et constituent les métabolites majoritaires lorsque ces souches sont cultivées en mode biofilm (**Figure 1**). De façon intéressante, les différents dérivés produits par le cluster des phénazines ne sont pas tous impactés dans les mêmes proportions par le mode de vie. En effet, chez la souche JV395B, la PCA n'est que peu impactée alors l'OH-PCA et l'OH-PHZ, issues de la modification de la PCA par une monooxygénase, sont parmi les composés les plus influencés par le mode de vie (**Figure 1**, Chin-A-Woeng et al. 2003, **Chapitre 2**). Ces résultats concordent avec l'étude de Maddula et al. réalisée en 2008 et suggèrent une fonction particulière des dérivés OH-PCA et OH-PHZ dans la formation de biofilm et leur maturation. Quatre autres composés produits par la souche F113 sont également très fortement augmentés en mode biofilm. Une comparaison de la fragmentation de ces molécules avec une

étude de Hildebrand et Budzikievitz réalisée en 1986, a permis de les caractériser comme des dérivés indoliques avec une chaîne aliphatique (i.e. dérivés lipophiles azotés, **Figure 1**). En revanche, depuis ce travail paru en 1986, aucune étude décrivant leur activité biologique n'a été retrouvée dans la littérature. L'augmentation de la production de ces composés en mode biofilm suggèrent une potentielle activité biologique en lien avec ce mode de vie telle qu'une implication dans la signalisation, l'expression des propriétés de surface ou dans la mise en place du biofilm.

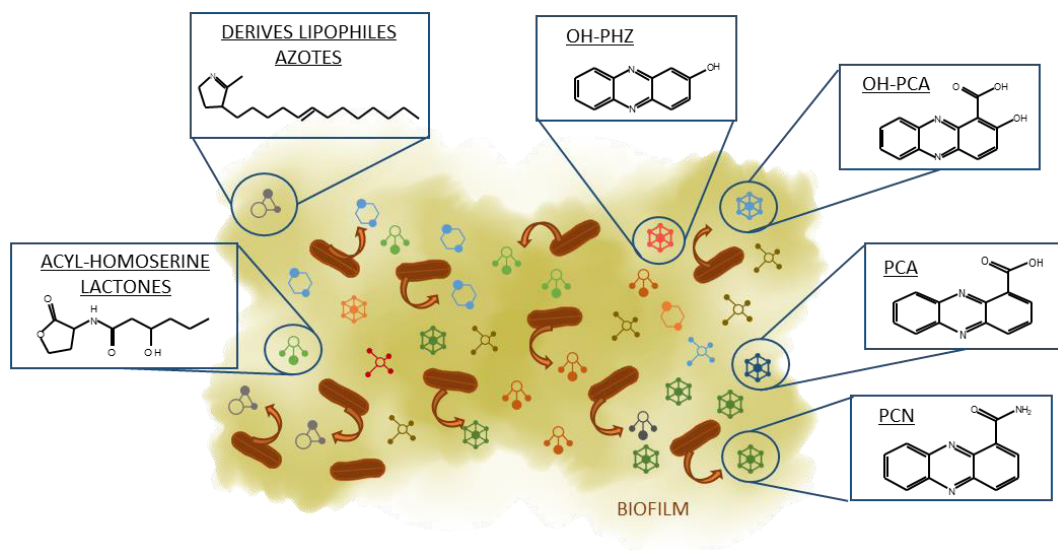


Figure 1 : Schéma récapitulatif des principales familles de métabolites bactériens dont la production est augmentée en mode biofilm. L'augmentation de la production de ces molécules en mode biofilm peut suggérer une implication dans des phénomènes associés au biofilm tels que la signalisation, l'expression de propriétés de surface ou encore un rôle dans la colonisation des souches sur les racines de blé. (PCA : phénazine-1-carboxylique ; OH-PCA : hydroxy-phénazine-1-carboxylique ; OH-PHZ : hydroxy-phénazine ; PCN : phénazine-1-carboxamide).

Les métabolites secondaires racinaires sont capables d'interférer avec la physiologie des *Pseudomonas*

L'analyse non ciblée montre que les extraits des trois génotypes de blé entraînent des modifications métaboliques importantes chez les cinq souches de *Pseudomonas*. Une disparité dans les proportions de métabolites bactériens produits en fonction des génotypes de blé suggère une potentielle spécificité d'interaction génotype × souche. Cette spécificité est plus marquée chez la souche *P. koreensis* JV222 qui réagit différemment à la présence des extraits

des géotypes Adular et Soissons. Il peut être intéressant de noter que JV222 possède moins de fonctions phytoprotectrices que les autres souches de l'étude qui appartiennent au clade CPC (*P. corrugata*/*P. protegens*/*P. chlororaphis*) (Vacheron et al 2016). L'analyse ciblée sur la production de métabolites secondaires impliqués dans l'activité phytobénéfique des souches montre que les extraits racinaires n'impactent pas de la même manière la production de toutes les molécules. La majorité des composés antimicrobiens voient par exemple leur production diminuée en présence des extraits racinaires. Ceci peut être dû au fait que les métabolites végétaux aient été extraits sur une plante saine. En effet lorsque le blé est infecté par des pathogènes, il produit des phytoalexines qui peuvent jouer un rôle dans les interactions avec les souches rhizosphériques (Ube et al. 2019). Une étude menée sur la souche *P. protegens* CHA0 a, par exemple, montré que la production de DAPG était favorisée lorsque la plante était infectée par un pathogène (Jousset et al. 2010).

D'autres composés, sont eux, fortement augmentés en présence des extraits racinaires des trois géotypes de blé. Les AHLs sont, par exemple, parmi les principales molécules dont la production est augmentée chez les deux souches de *P. chlororaphis*. D'autres composés tels que les phénazines ont également une production modifiée avec des disparités en fonction des différents dérivés produits par une même voie de biosynthèse. En effet, chez, la souche *P. chlororaphis* JV395B, par exemple, la PCA est diminuée en présence des extraits racinaires alors que les dérivés OH-PCA et OH-PHZ sont eux fortement augmentés avec des différences de proportions selon les géotypes (Figure 2). La production de phénazines est décrite dans la littérature pour être sous le contrôle du QS (Morohoshi et al. 2017). L'augmentation parallèle de ces deux familles de molécules en présence des extraits peut donc être associée à un phénomène physiologique commun à savoir la production de biofilm ou d'agrégats bactériens. Plusieurs études ont, en effet, mis en évidence que la plante pouvait favoriser la production de biofilm chez des bactéries rhizosphériques (Beauregard et al. 2013, Habib et al. 2017). Des expérimentations complémentaires sur les souches de notre étude, ont montré que les extraits racinaires favorisaient la production de biofilm chez les deux souches de *P. chlororaphis* (Chapitre 3). Or l'analyse du métabolisme des souches en fonction de leur mode de vie nous a montré que les AHLs et les phénazines étaient très fortement surproduites lorsque les souches étaient cultivées en mode biofilm (Figure 1). L'association de ces données suggère un potentiel lien entre l'augmentation de ces métabolites et la formation de biofilm en présence

des métabolites végétaux. L'implication de ces molécules dans la production de biofilm a été décrits dans plusieurs études (Maddula et al. 2006), mais les analyses réalisées au cours de ces travaux de thèse soulignent le rôle différentiel que peuvent jouer les différents dérivés phénazines et plus particulièrement celui de l'OH-PHZ qui est le dérivé le plus augmenté à la fois lorsque la souche JV395B est cultivé en mode biofilm et en présence des extraits racinaires mais dont l'activité biologique n'a encore été que très peu analysée dans la littérature.

De la même manière, des molécules azotées présentant une chaîne aliphatique (**Figure 1 et 2**) fortement surproduite par la souche F113 en mode biofilm, sont également parmi les composés dont la production est augmentée en présence des extraits racinaires. En revanche, contrairement à ce qui a été observé chez les *P. chlororaphis*, la production de biofilm chez *P. kilonensis* F113 n'est pas augmentée en présence des extraits racinaires de blé. Il faut noter que l'analyse du métabolisme (chapitre 2) a été réalisée en mode biofilm colonies alors que la production de biofilm étudiée dans le chapitre 3 a été mesurée sur des biofilm fixés. Le métabolisme des souches peut être différent en fonction du type de biofilm (Mikkelsen et al. 2007). Nous ne pouvons donc pas exclure que ces molécules présentent une activité biologique en lien avec le phénotype biofilm colonies telle que l'expression de propriétés de surface ou l'agrégation.

D'autres molécules voient également leur production modifiée en présence des extraits. C'est le cas par exemple des sidérophores tel que la pyochéline ou le PDTC. Mais si la production de pyochéline a tendance à être diminuée au profit des précurseurs de sa voie de biosynthèse, le PDTC lui est parmi les molécules dont la production est la plus augmentée chez la souche F113 cultivée en présence d'extraits racinaires. L'activité de cette molécule dans la chélation des métaux présent dans le sol a pu être mise en évidence dans plusieurs études (Cortese et al. 2002, Cornelis 2010, Zawadzka et al. 2006). Néanmoins, son rôle dans les interactions rhizosphériques, n'a encore été que peu étudié dans la littérature et jamais dans le cadre des interactions plante-bactérie. Or la compétition pour les métaux tels que le fer est particulièrement importante dans la rhizosphère et certains sidérophores tels que la pyoverdine joue un rôle important dans les interactions plante-bactéries (Höfte et al. 1992)

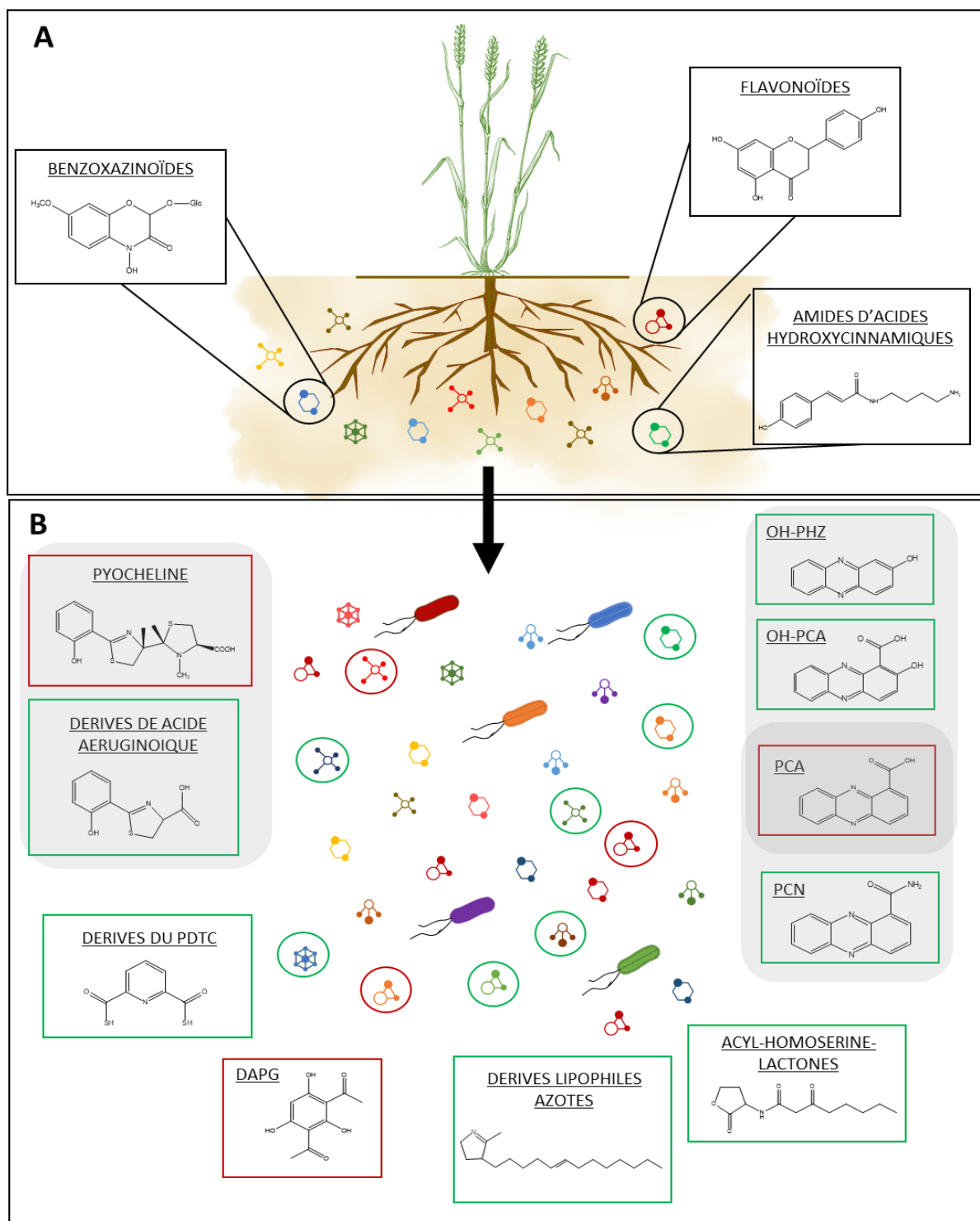


Figure 2 : Schéma récapitulatif des principaux médiateurs chimiques de l'interaction blé-*Pseudomonas* mis en évidence dans cette étude. Sont représentées, les principales familles de métabolites annotés dans les extraits racinaires et pouvant avoir un impact sur la physiologie des *Pseudomonas* (A) et les principaux métabolites bactériens dont la production est modifiée en présence des extraits racinaires (B). Sont encadrés en vert les métabolites bactériens dont la production est augmentée et en rouge ceux dont la production est diminuée en présence des extraits racinaires. Les cadres gris regroupent les composés issus d'une même voie de biosynthèse. (PCA : phénazine-1-carboxylique ; OH-PCA : hydroxy-phénazine-1-carboxylique ; OH-PHZ : hydroxy-phénazine ; PCN : phénazine-1-carboxamide, DAPG : 2,4 diacétylphloroglucinol, PDTC pyrimidine, 2, 6 thiocarboxylique).

Retour sur la plante : impact de ces modifications métaboliques sur le blé

Nous avons vu que les extraits racinaires entraînaient de nombreuses modifications phénotypiques sur les souches de *Pseudomonas*. Mais la question qui se pose est de savoir si ces modifications métaboliques peuvent avoir une incidence sur le blé lui-même ?

Pour répondre à cette question, nous avons réalisé une expérimentation avec les génotypes Adular et Bordeaux et les souches *P. kilonensis* F113 et *P. chlororaphis* JV395B en sol non stérile. Les génotypes Adular et Bordeaux ont été sélectionnés pour cette dernière étape car ils impactent de manière différentielle la voie de biosynthèse des phénazines chez la souche JV395B ce qui suggère une éventuelle spécificité d'interaction (**Chapitre 3**). Dans cette dernière expérimentation, nous avons cherché à évaluer, premièrement, si les deux souches phytoprotectrices entraînaient des modifications du métabolisme racinaire chez les deux génotypes de blé ; deuxièmement, à savoir si une modification différentielle était induite par les souches F113 et JV395B lorsque ces dernières avaient été préalablement conditionnées avec des extraits racinaires ; enfin troisièmement, à mettre en évidence une éventuelle spécificité de réponse du blé selon s'il est inoculé avec une souche conditionnée par son propre extrait racinaire ou par celui d'un autre génotype de blé (**Figure 3**).

La première étape nous a permis de mettre en évidence que les souches *P. kilonensis* F113 et *P. chlororaphis* JV395B entraînaient une réponse métabolique différentes sur les deux génotypes de blé suggérant une spécificité souche × génotype. Des résultats similaires ont été mis en évidence dans plusieurs études précédentes portant sur l'interaction de souches phytostimulatrices sur d'autres *Poaceae* telles que le maïs ou le riz ([Walker et al. 2011](#), [Chamam et al. 2015](#), [Valette et al. 2019](#), [Rozier et al. 2016](#)).

La deuxième étape a permis de mettre en évidence une réponse différentielle entre les plants inoculés par des souches conditionnées et ceux inoculés par des souches non conditionnées dans les interactions Adular × F113, Adular × JV395B et Bordeaux × JV395B. De façon intéressante, le métabolisme du génotype Adular est plus impacté par les souches conditionnées que par les souches non conditionnées. Cet effet est particulièrement marqué lors de l'interaction Adular × JV395B. Ces données suggèrent que la modification de la physiologie de la souche JV395B lors du conditionnement, accentue son effet biologique sur ce génotype de blé. La caractérisation des métabolites végétaux modifiés par l'inoculation,

montre une modification de la production de composés connus pour être impliqués dans les interactions biotiques tels que les benzoxazinoïdes, les HCAA ou encore les flavonoïdes (Zhou et al. 2018, Valette et al. 2019, Weston and Mathesius 2013). L'inoculation de la souche JV395B entraîne, par exemple sur le génotype Adular, une diminution des benzoxazinoïdes glycosylés, particulièrement lorsque la souche a été préalablement conditionnée. Les benzoxazinoïdes sont produits dans la racine et stockés dans la vacuole sous formes glycosylés. Ils peuvent ensuite être exsudés dans la rhizosphère où ils sont en contact avec des β -glucosidases qui donnent les formes aglycones, plus actives (Wouters et al. 2016). Au niveau racinaire, la diminution des benzoxazinoïdes glycosylés peut signifier (i) une augmentation de leur exsudation et une dégradation de ces molécules par les micro-organismes du sol, ou (ii) une diminution de leur production du fait d'un effet signal de la souche JV395B. Des études réalisées sur le maïs montrent que les benzoxazinoïdes peuvent avoir un effet différentiel sur différents taxa microbiens et jouer un rôle important dans la mise en place du rhizomicrobiote notamment via une activité chimio-attractante (Neal et al. 2012, Hu et al. 2018). Notre étude, associée à celle de Walker et al. en 2011 montre que les bactéries rhizosphériques sont également capables de moduler la production de benzoxazinoïdes ce qui pourrait avoir un impact sur leur installation dans la rhizosphère.

D'autres composés tels que les amides d'acides hydroxycinnamiques (HCAA) sont également différenciellement produits suite à l'inoculation des blés par les souches de *Pseudomonas*, particulièrement par la souche JV395B conditionnée. Trois dérivés ont pu être caractérisés, la sinapoyl-agmatine et la féruloyl-putrescine dont la production est augmentée, et la coumaroyl-cadavérine dont la production est diminuée. Récemment, une étude métabolomique réalisée sur l'interaction entre le riz et des bactérie phytostimulatrices a également montré une production différentielle de ces molécules entre la plante inoculée et non inoculée (Valette et al. 2019). Or, l'activité des HCAA dans les interactions de la plante avec les bactéries rhizosphériques reste encore en grande partie inconnue. Nos données associées à celles obtenues dans l'étude de Valette et al. en 2019 montrent l'importance d'évaluer l'activité biologique de ces molécules dans les interactions.

Enfin, les résultats de l'analyse des modifications métaboliques entraînées lors des interactions Adular \times F113 et Bordeaux \times JV395B montrent que, dans ces deux cas, la souche conditionnée avec un extrait racinaire appartenant à un autre génotype de blé que celui sur

lequel elle est inoculée, entraîne des modifications métaboliques particulières. Cette particularité questionne mais peut être mise en regard des résultats obtenus dans le chapitre 3 montrant un impact différent des génotypes de blé sur le métabolisme secondaire des souches après 6 jours d'incubation. La souche JV395B conditionnée par Bordeaux présentait, par exemple, un métabolisme légèrement différent de celle conditionnée par Adular, notamment au niveau de la voie de biosynthèse des phénazines. On peut se poser la question de l'évolution de ces différences métaboliques dans la rhizosphère, après inoculation. Ces résultats peuvent également suggérer une reconnaissance différentielle par la plante de bactéries ayant été préalablement en contact avec un génotype de blé différent (**Figure 3**).

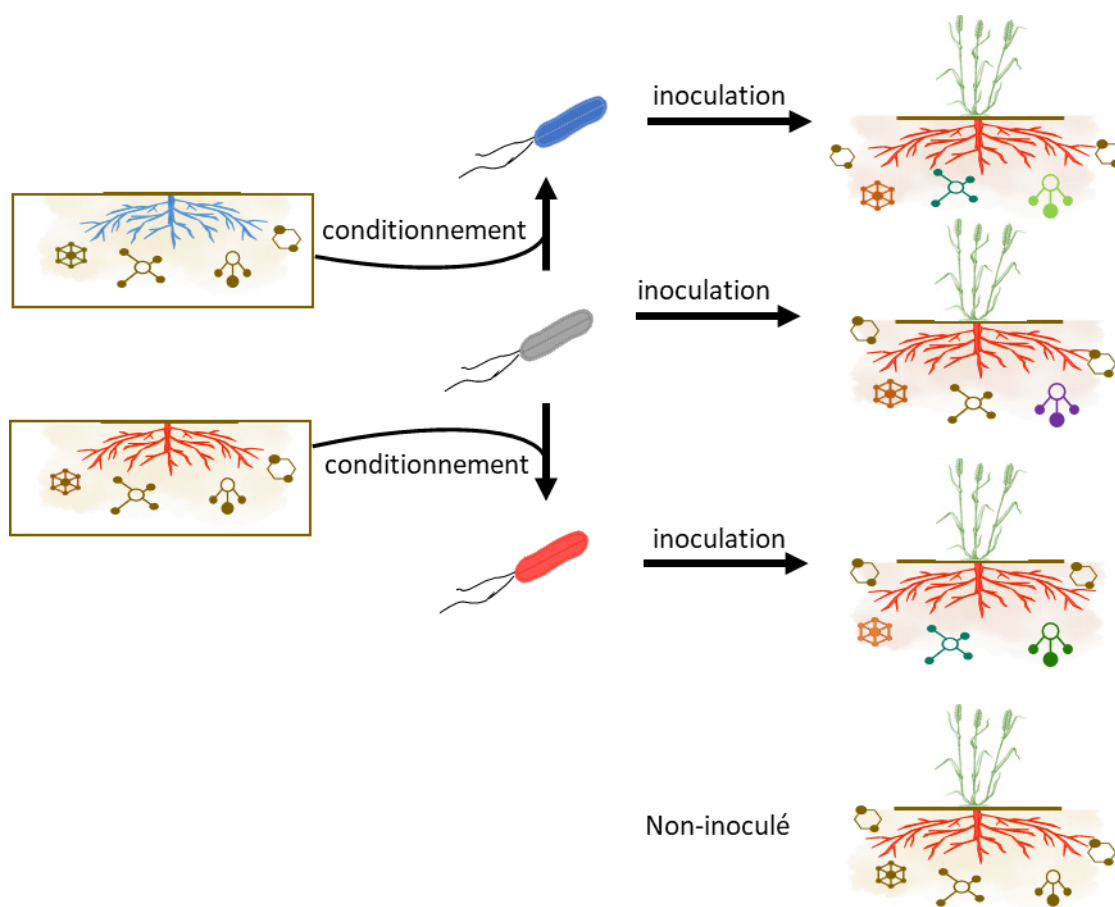


Figure 3 : Impact d'une souche conditionnée et non conditionnée sur le métabolisme racinaire du blé. La souche bactérienne est conditionnée par des extraits racinaires appartenant à deux génotypes de blé différents. Les souches issues de chacun des conditionnements sont ensuite inoculées au niveau de la rhizosphère du génotype rouge. L'inoculation des souches entraîne des modifications du métabolisme racinaire du blé par rapport à la condition non-inoculée. De plus, la modification du métabolisme racinaire après l'inoculation est différente en fonction du conditionnement des souches. Ce type d'effet a pu être mis en évidence sur trois des quatre interactions testées (Adular × F113, Adular × JV395B et Bordeaux × JV395B).

Perspectives

Plusieurs expérimentations supplémentaires pourraient nous permettre de préciser notre compréhension de ces interactions. Dans un premier temps, une **l'utilisation de mutants et des molécules pures** pourrait nous permettre de caractériser l'activité biologique des médiateurs identifiés.

Nos résultats ont mis en évidence plusieurs molécules bactériennes dont la production est modifiée en présence des métabolites racinaires. Les AHLs et les dérivés phénazines tels que l'OH-PCA, l'OH-PHZ et la PCN sont par exemple fortement augmentés chez les souches de *P. chlororaphis* en présence des extraits racinaires. Cette augmentation peut être associée à un phénotype biofilm (**Figure 1 et 2**). L'utilisation de mutants chez lesquels la transformation de la PCA en OH-PCA et OH-PHZ chez JV395B et en PCN chez JV497 serait inhibée, pourrait permettre de mieux comprendre l'impact différentiel de ces médiateurs dans l'interaction des *Pseudomonas* avec la plante. La formation de biofilm étant directement associée à la colonisation racinaire des souches, il serait également intéressant de comparer la colonisation du mutant par rapport à la souche sauvage. De la même manière, chez la souche *P. protegens* CHA0, la présence des extraits racinaires diminue la production de la pyochéline au profit des précurseurs dans la voie de biosynthèse (**Figure 2**). Ici également, l'utilisation de mutants pourrait permettre de mieux comprendre l'activité biologique différentielle des différents composés de cette voie de biosynthèse. Notre analyse a également pu mettre en évidence chez la souche *P. kilonensis* F113 deux familles de molécules encore jamais étudiées dans le cadre des interactions plante-bactéries, à savoir, les dérivés du PDTC et les dérivés azotés avec une chaîne aliphatique (**Figure 1 et 2**). En ce qui concerne le PDTC, les gènes de biosynthèse sont connus et la construction d'un mutant pourrait ici également permettre de mieux comprendre le rôle de cette molécule. Pour les molécules azotées en revanche, une identification des gènes de biosynthèse serait indispensable pour en savoir davantage sur leur activité. La recherche de ces gènes dans les membres de communauté rhizosphérique pourrait également permettre de savoir si leur production constitue un trait compétitif important chez les bactéries rhizosphériques. Enfin, il ne faut pas oublier que ces molécules ont été extraites dans le surnageant de culture. Elles ont par conséquent été excrétées par les bactéries dans le milieu et ont potentiellement une activité signal sur la plante ou les autres membres de la communauté rhizosphérique. Des tests d'activités des molécules pures sur la plante ou d'autres

bactéries rhizosphériques pourraient également permettre de caractériser leur activité biologique.

L'inoculation des bactéries sur les génotypes de blé entraîne également une modification de la production de plusieurs métabolites racinaires. Ces mêmes métabolites, contenus initialement dans les extraits racinaires montrent également un impact sur le métabolisme des *Pseudomonas*. Plusieurs composés bioactifs tels que des flavonoïdes, des HCAA ou encore des benzoxazinoïdes sont en effet présents dans les extraits racinaires. Mais si l'activité biologique de ces molécules est souvent bien décrite dans les interactions mutualistes ou dans la résistance contre des pathogènes, leur rôle dans les interactions de la plante avec les bactéries rhizosphériques reste encore mal connu (**chapitre 1**). L'évaluation de l'activité de ces molécules seules ou en synergies sur la physiologie des *Pseudomonas* pourrait permettre de mieux comprendre leurs rôles spécifiques dans les interactions. Nous pouvons également noter que de nombreux autres composés non annotés et dont la production est modifiée après l'inoculation des souches ont été mis en évidence dans les extraits racinaires. Une approche par fractionnement bio-guidé pourrait permettre de caractériser de nouveaux métabolites racinaires médiateurs de l'interaction du blé avec les *Pseudomonas*. Il faut tout de même garder à l'esprit que les molécules contenues dans les extraits racinaires peuvent agir en synergie et que le fractionnement de l'extrait pourrait diminuer son activité sur les *Pseudomonas*.

Dans un second temps, des expérimentations sur des **modèles biologiques différents** pourraient également nous permettre de mieux comprendre les interactions. Nous avons par exemple mis en évidence que la souche *P. koreensis* JV222 présentait une spécificité de réponse aux différents génotypes de blé utilisés plus importante que les autres souches de l'étude. Or cette souche est la seule de l'étude à posséder moins de propriétés phytobénéfiques et à ne pas appartenir au clade CPC ([Vacheron et al. 2016](#)). Il serait ainsi intéressant de comparer les différences d'effet sur les génotypes de cette souche lorsqu'elle est ou non conditionnée par ces mêmes génotypes de blé, afin d'évaluer le niveau de spécificité observé avec cette souche. De plus, développer notre analyse sur plusieurs souches de *Pseudomonas* appartenant aux clades CPC et FMJK (*P. fluorescens*, *P. mandelii*, *P. jessenii*, *P. koreensis*) nous permettrait d'effectuer un lien entre les propriétés des souches et la spécificité d'interaction avec les génotypes de blé. De la même manière, notre étude réalisée sur des plantes en bonne santé n'a pas montré de réelle augmentation des propriétés phytoprotectrices des souches en

présence des extraits. L'application de notre protocole expérimental sur une plante contaminée avec un pathogène pourrait nous permettre d'évaluer si la plante a un impact différent sur la production de métabolites phytoprotecteurs lorsqu'elle est infectée par un pathogène.

Enfin, une perspective à plus long terme serait de **prendre en compte les interactions entre micro-organismes**. En effet, lors de notre dernière expérimentation, la mesure de l'impact différentiel des souches conditionnées sur la plante hôte a été réalisée après inoculation du blé dans du sol non stérile. Nous ne pouvons pas exclure que l'effet mesuré sur le métabolisme racinaire du blé ne soit pas le résultat d'un effet direct sur la plante mais plutôt d'un effet sur la communauté rhizosphérique qui aboutirait à une réponse différentielle de la plante. Nous savons à l'heure actuelle que les bactéries rhizosphériques évoluent au sein d'une communauté complexe et organisée, le rhizomicrobiote. Plusieurs études ont montré que la sélection des taxa qui composent ce rhizomicrobiote est elle-même sous le contrôle de la plante notamment par le biais de métabolites secondaires (Cotton et al. 2019, Voges et al. 2019, Stringlis et al. 2018, Huang et al. 2019). Plus que la sélection de taxa particuliers, la plante sélectionne avant tout des fonctions microbiennes qui pourront l'aider dans son développement (Lemanceau et al. 2017, Hu et al. 2018, Cotton et al. 2019). De façon intéressante, nos travaux ont pu mettre en évidence que la présence des extraits racinaires favorise la production de molécules impliquées dans la signalisation bactérienne (**Chapitre 3**). Une prochaine étape de ce travail serait par conséquent d'évaluer l'impact de la plante sur les interactions microbiennes au sein de la communauté rhizosphérique. Une première stratégie serait d'évaluer si une bactérie préalablement conditionnée a un impact différent sur d'autres membres de la communauté. L'analyse différentielle de l'effet de surnageants bactériens issus de souches conditionnées et non conditionnées sur le phénotype d'autres bactéries rhizosphériques pourraient, par exemple, conduire à une meilleure compréhension de l'impact de la plante sur les interactions bactérie-bactérie. Une deuxième stratégie de modélisation pourrait être de mettre en place une communauté microbienne synthétique comprenant plusieurs souches rhizosphériques présentant des propriétés phytobénéfiques différentes. Une analyse phénotypique et métabolomique de la communauté synthétique en présence et en absence des extraits racinaires pourrait permettre d'évaluer l'impact des métabolites végétaux sur les interactions et sur la physiologie des souches de la communauté synthétique.

Conclusion générale

Du fait de leur toxicité et du risque qu'ils entraînent à la fois pour la santé des agriculteurs et des consommateurs, le traitement des cultures par des produits phytosanitaires est de plus en plus controversée. Dans ce contexte, l'utilisation de bactéries PGPR pour favoriser la croissance des plantes et augmenter leur résistance contre les maladies semble être une alternative prometteuse. Les PGPR sont des organismes vivants qui vivent dans la rhizosphère au sein d'une communauté complexe, le rhizomicrobiote. Pour pouvoir exprimer leurs propriétés phytobénéfiques, elles doivent coloniser les racines des plantes et s'installer dans la communauté rhizosphérique (Seong et al. 1992, Vacheron et al. 2013). Elles adoptent dans la rhizosphère un mode de vie particulier, le biofilm, et sont en perpétuelle interaction avec la plante hôte et les autres membres de la communauté microbienne. Mieux comprendre l'impact que peut avoir cet environnement sur la physiologie et l'expression des propriétés phytobénéfiques des PGPR est un prérequis nécessaire pour optimiser leur utilisation dans le domaine du biocontrôle. Le double objectif de notre étude était d'utiliser une approche métabolomique afin d'évaluer l'impact des interactions sur la physiologie des organismes et de mettre en évidence des médiateurs chimiques de l'interaction blé-*Pseudomonas*.

Récemment, une étude de Pandin *et al.* a souligné l'importance de prendre en compte le mode biofilm dans l'étude de l'activité phytobénéfique des PGPR (Pandin et al. 2017). Le mode biofilm est le mode de vie le plus couramment adopté par les bactéries dans l'environnement et conduit à une physiologie différente des cellules de celle adoptée en mode planctonique (Flemming et al. 2016). L'approche métabolomique développée dans notre étude apporte une preuve des modifications métaboliques entre le mode biofilm et le mode planctonique chez des souches *Pseudomonas* phytoprotectrices. Nous avons, par exemple, montré que la production de plusieurs métabolites secondaires fondamentaux dans l'activité phytoprotectrice de *Pseudomonas* tels que les AHLs ou les phénazines était fortement augmentée en mode biofilm. Ces données, associées au fait que la plante puisse favoriser la production de biofilm chez plusieurs souches phytobénéfiques (Chapitre 3, Beauregard et al. 2013, Habib et al. 2017) confirment l'importance de la prise en compte des biofilms dans la préparation des inocula bactériens utilisés comme produits de biocontrôle.

La deuxième partie de notre étude était d'évaluer l'impact des métabolites racinaires du blé sur la survie et la physiologie des *Pseudomonas* rhizosphériques. Nous avons pu montrer que le blé avait la capacité de modifier la production de plus de la moitié des métabolites

secondaires bactériens chez certaines souches de *Pseudomonas*, avec des spécificités en fonction du génotype de blé et de la souche impliquée. Les métabolites racinaires peuvent, par exemple, modifier la production de sidérophores, de médiateurs du Quorum Sensing ou encore de certains composés antimicrobiens. Nous avons également pu mettre en évidence deux familles de molécules (i.e. les dérivés du PDTC et les composés lipophiles azotés) dont la production est fortement augmentée en présence des extraits racinaires de blé mais dont l'activité biologique dans les interactions plante-bactérie n'a encore jamais été étudiée.

L'importance de l'impact des extraits racinaires sur le métabolisme secondaire des souches nous a conduit à tester l'effet de ces modifications directement sur le blé en sol non stérile. Les résultats de cette expérience ont montré que, le blé réagissait de manière différentielle à l'inoculation des souches conditionnées et non conditionnées. De façon surprenante, cet impact pouvait également être différent selon si la souche avait été conditionnée avec un extrait du génotype inoculé ou avec celui d'un autre génotype de blé. Ces derniers travaux ont confirmé que l'impact des extraits racinaires sur le métabolisme des souches pouvait conduire à un effet différentiel sur la plante hôte dans des conditions partiellement contrôlées. Ces résultats montrent l'intérêt que peut représenter une étape de pré-conditionnement des souches bactériennes avant leur inoculation sur la plante. Ils constituent également des éléments importants à prendre en compte lors de la formulation d'inocula utilisés comme produits de biocontrôle.

Les travaux réalisés au cours de cette thèse ont permis une caractérisation de l'impact du mode de vie et des interactions PGPR-plante sur la physiologie et l'expression des propriétés phytobénéfiques des *Pseudomonas*. Ils ont soulevé des points concrets à prendre en compte dans l'utilisation appliquée des PGPR en agriculture. Ils ont également permis la mise en évidence de plusieurs médiateurs d'interaction entre la plante et les *Pseudomonas*. Ils forment un point de départ à de nombreuses perspectives à la fois pour définir l'activité biologique des médiateurs mis en évidence au cours de l'étude, mais également utiliser cette approche pour étudier d'autres interactions mettant en jeu d'autres organismes.

Références introduction
générale et discussion
générale

- Bais HP, Weir T L, Perry LG, Gilroy S & Vivanco JM. 2006. the role of root exudates in rhizosphere interactions with plants and other organisms. *Annual Review of Plant Biology*, **57**: 233–266.
- Beauregard PB, Chai Y, Vlamakis H, Losick R & Kolter R. 2013. *Bacillus subtilis* biofilm induction by plant polysaccharides. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **110**: 1621–1630.
- Beleggia R, Platani C, Nigro F, Vita P De, Cattivelli L & Papa R. 2013. Effect of genotype, environment and genotype-by-environment interaction on metabolite profile in durum wheat (*Triticum durum* Desf.) grain. *Journal of Cereal Science*, **57**: 183–192.
- Bulgarelli D, Garrido-Oter R, Münch P C, Weiman A, Dröge J, Pan Y, Schulze-Lefert P. 2015. Structure and function of the bacterial root microbiota in wild and domesticated barley. *Cell Host and Microbe*, **17**: 392–403.
- Chamam A, Wisniewski-Dyé F, Comte G, Bertrand C & Prigent-Combaret C. 2015. Differential responses of *Oryza sativa* secondary metabolism to biotic interactions with cooperative, commensal and phytopathogenic bacteria. *Planta*, **242**: 1439–1452.
- Chin-A-Woeng TFC, Bloemberg GV & Lugtenberg B J J. 2000. Phenazines and their role in biocontrol by *Pseudomonas* bacteria. *New Phytologist*, **157**: 503–523.
- Combes-Meynet E, Pothier JF, Moëgne-Loccoz Y & Prigent-Combaret C. 2011. The *Pseudomonas* secondary metabolite 2,4-diacetylphloroglucinol is a signal inducing rhizoplane expression of *Azospirillum* genes involved in plant-growth promotion. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, **24**: 271–284.
- Cornelis P. 2010. Iron uptake and metabolism in pseudomonads. *Applied Microbiology and Biotechnology*, **86**: 1637–1645.
- Cortese MS, Paszczynski A, Lewis TA, Sebat JL, Borek V & Crawford RL. 2002. Metal chelating properties of pyridine-2,6-bis(thiocarboxylic acid) produced by *Pseudomonas* spp. and the biological activities of the formed complexes. *BioMetals*, **15**: 103–120.
- Cotton TEA, Pétriacq P, Cameron DD, Meselmani M.AI, Schwarzenbacher R., Rolfe SA & Ton J. 2019. Metabolic regulation of the maize rhizobiome by benzoxazinoids. *ISME Journal*, **13**: 1647–1658.
- Van Dam NM & Bouwmeester HJ. 2016. Metabolomics in the Rhizosphere: Tapping into Belowground Chemical Communication. *Trends in Plant Science*, **21**: 256–265.
- Deveau A, Gross H, Palin B, Mehnaz S, Schnepf M, Leblond P, Aigle B. 2016. Role of secondary metabolites in the interaction between *Pseudomonas fluorescens* and soil microorganisms under iron-limited conditions. *FEMS Microbiology Ecology*, **92**: 1–11.
- Dinelli G, Segura-Carretero A, Di Silvestro R, Marotti I, Arráez-Román D, Benedettelli S, Fernandez-Gutierrez A. 2011. Profiles of phenolic compounds in modern and old common wheat varieties

- determined by liquid chromatography coupled with time-of-flight mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, **1218**: 7670–7681.
- Drogue B, Doré H, Borland S, Wisniewski-Dyé F & Prigent-Combaret C. 2012. Which specificity in cooperation between phytostimulating rhizobacteria and plants? *Research in Microbiology*, **163**: 500–510.
- Faure D, Simon J C & Heulin T. 2018. Holobiont: a conceptual framework to explore the eco-evolutionary and functional implications of host–microbiota interactions in all ecosystems. *New Phytologist*, **218** : 1321–1324.
- Favre L, Ortalo-Magné A, Pichereaux C, Gargaros A, Burlet-Schiltz O, Cotellet, V & Culioli, G. 2018. Metabolome and proteome changes between biofilm and planktonic phenotypes of the marine bacterium *Pseudoalteromonas lipolytica* TC8. *Biofouling*, **34**: 132–148.
- Flemming HC, Wingender J, Szewzyk U, Steinberg P, Rice S A & Kjelleberg S. 2016. Biofilms: an emergent form of bacterial life. *Nature Reviews Microbiology*, **14**: 563–575.
- Glavina T, Jones CD, Lebeis SL, Paredes SH, Lundberg DS, Breakfield N, Dangl, JL. 2015. Salicylic acid modulates colonization of the root microbiome by specific bacterial taxa. *Science*, **349** : 860–864.
- Gotti R, Amadesi E, Fiori J, Bosi S, Bregola V, Marotti I & Dinelli G. 2018. Differentiation of modern and ancient varieties of common wheat by quantitative capillary electrophoretic profile of phenolic acids. *Journal of Chromatography A*, **1532**: 208–215.
- Gross H & Loper, JE. 2009. Genomics of secondary metabolite production by *Pseudomonas* spp **0**: 1408–1446.
- Habib C, Yu Y, Gozzi K, Ching C, Shemesh M. & Chai Y. 2017. Characterization of the regulation of a plant polysaccharide utilization operon and its role in biofilm formation in *Bacillus subtilis*. *PLoS ONE*, **12** : 1–24.
- Haichar Z, Santaella C & Heulin T. 2014. Soil Biology & Biochemistry Root exudates mediated interactions belowground. *Soil Biology and Biochemistry*, **77**: 69–80.
- Hildebrand, U. and Budzikiewicz, H. (1986) (+)-3,4-Dihydro-5-methyl-4-n-alkyl- und alkenyl-2H-pyrrole aus *Pseudomonas putida*. *Z. Naturforsch* **41**: 1161-1169.
- Höfte M, Boelens J & Verstraete W. 1992. Survival and root colonization of mutants of plant growth-promoting pseudomonads affected in siderophore biosynthesis or regulation of siderophore production. *Journal of Plant Nutrition*, **15**: 2253–2262.
- Hu L, Robert CAM., Cadot S, Zhang X, Ye M, Li B, Erb M. 2018. Root exudate metabolites drive plant-soil feedbacks on growth and defense by shaping the rhizosphere microbiota. *Nature Communications*, **9**: 1–13.

- Huang AC, Jiang T, Liu Y X, Bai Y C, Reed J, Qu B, Osbourn A. 2019. A specialized metabolic network selectively modulates *Arabidopsis* root microbiota. *Science*, **364** (6440).
- Jousset A, Rochat L, Scheu S, Bonkowski M & Keel C. 2010. Predator-prey chemical warfare determines the expression of biocontrol genes by rhizosphere-associated *Pseudomonas fluorescens*. *Applied and Environmental Microbiology*, **76**: 5263–5268.
- Lemanceau P, Blouin M, Muller D & Moënne-Loccoz Y. 2017. Let the Core Microbiota Be Functional. *Trends in Plant Science*, **22**: 583–595.
- Maddula VSRK, Pierson EA & Pierson LS. 2008. Altering the ratio of phenazines in *Pseudomonas chlororaphis* (*aureofaciens*) strain 30-84: Effects on biofilm formation and pathogen inhibition. *Journal of Bacteriology*, **190**: 2759–2766.
- Maddula VSRK, Zhang Z, Pierson EA & Pierson LS. 2006. Quorum sensing and phenazines are involved in biofilm formation by *Pseudomonas chlororaphis* (*aureofaciens*) strain 30-84. *Microbial Ecology*, **52**: 289–301.
- Mavrodi DV, Mavrodi OV, Elbourne LDH, Tetu S, Bonsall RF, Parejko J, Thomashow LS. 2018. Long-Term Irrigation Affects the Dynamics and Activity of the Wheat Rhizosphere Microbiome. *Frontiers in Plant Science*, **9**(3).
- Mikkelsen H, Duck Z, Lilley K S & Welch M. 2007. Interrelationships between colonies, biofilms, and planktonic cells of *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Bacteriology*, **189**: 2411–2416.
- Morohoshi T, Yamaguchi T, Xie X, Wang W, Takeuchi K & Someya N. 2017. Complete Genome Sequence of *Pseudomonas chlororaphis* subsp. *aurantiaca* Reveals a Triplicate Quorum-Sensing Mechanism for Regulation of Phenazine Production. *Microbes and Environments*, **32**: 47–53.
- Nadell C D, Drescher K & Foster K R. 2016. Spatial structure, cooperation and competition in biofilms. *Nature Reviews. Microbiology*, **14**: 589–600.
- Neal A L, Ahmad S, Gordon-Weeks R & Ton J. 2012. Benzoxazinoids in root exudates of maize attract *Pseudomonas putida* to the rhizosphere. *PLoS ONE*, **7**(4).
- Oburger E & Schmidt H. 2015. New methods to unravel rhizosphere processes. *Trends in Plant Science*, **xx**, 1–13.
- Pandin C, Le Coq D, Canette A, Aymerich S & Briandet R. 2017. Should the biofilm mode of life be taken into consideration for microbial biocontrol agents? *Microbial Biotechnology*, **10**: 719–734.
- Pérez-Montaño F, Alías-Villegas C, Bellogín RA, del Cerro P, Espuny MR, Jiménez-Guerrero I, López-Baena FJ, Ollero FJ, Cubo T (2014) Plant growth promotion in cereal and leguminous agricultural important plants: from microorganism capacities to crop production. *Microbiol Res* **169**: 325–336

- Philippot L, Raaijmakers J M, Lemanceau P & van der Putten WH. 2013. Going back to the roots: the microbial ecology of the rhizosphere. *Nature Reviews Microbiology*, **11**: 789–799.
- Price-Whelan A, Dietrich LEP & Newman DK. 2006. Rethinking “secondary” metabolism: physiological roles for phenazine antibiotics. *Nature Chemical Biology*, **2**: 71–78.
- Raaijmakers JM, de Bruijn I, Nybroe O & Ongena M. 2010. Natural functions of lipopeptides from *Bacillus* and *Pseudomonas*: More than surfactants and antibiotics. *FEMS Microbiology Reviews*, **34**: 1037–1062.
- Rosenberg E & Zilber-Rosenberg I. 2016. Microbes drive evolution of animals and plants: The hologenome concept. *MBio*, **7**: 1–8.
- Roussel V, Koenig J, Beckert M, Balfourier F (2004) Molecular diversity in French bread wheat accessions related to temporal trends and breeding programmes. *Theor Appl Genet* **108**: 920–930.
- Rozier, C., Erban, A., Hamzaoui, J., Prigent-Combaret, C. and Comte, G. (2016) Xylem Sap Metabolite Profile Changes During Phytostimulation of Maize by the Plant Growth-Promoting Rhizobacterium, *Azospirillum lipoferum* CRT1. *Metabolomics* **6**: 2153–0769.
- Sanchez S & Demain A L. 2019. Secondary metabolites. *Comprehensive Biotechnology*, 131–143.
- Sanguin H, Sarniguet A, Gazengel K, Moëgne-Loccoz Y & Grundmann G L. 2009. Rhizosphere bacterial communities associated with disease suppressiveness stages of take-all decline in wheat monoculture. *The New Phytologist*, **184**: 694–707.
- Sasse J, Martinoia E & Northe, T. 2018. Feed Your Friends: Do Plant Exudates Shape the Root Microbiome? *Trends in Plant Science*, **23**: 25–41.
- Seong K Y, Höfte M & Verstraete W. 1992. Acclimatization of plant growth promoting *Pseudomonas* strain 7NSK2 in soil: Effect on population dynamics and plant growth. *Soil Biology and Biochemistry*, **24**: 751–759.
- Stoodley, P., Sauer, K., Davies, D.G., and Costerton, J.W. 2002 Biofilms as Complex Differentiated Communities. *Annu Rev Microbiol* **56**: 187–209.
- Stringlis I A, Yu K, Feussner K, De Jonge R, Van Bentum S, Van Verk MC, Pieterse CMJ. 2018. MYB72-dependent coumarin exudation shapes root microbiome assembly to promote plant health. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 115(22).
- Ube N, Harada D, Katsuyama Y, Osaki-Oka K, Tonooka T, Ueno K, Ishihara A. 2019. Identification of phenylamide phytoalexins and characterization of inducible phenylamide metabolism in wheat. *Phytochemistry*, **167**: 112098.
- Vacheron J, Desbrosses G, Bouffaud ML, Touraine B, Moëgne-Loccoz Y, Muller D, Prigent-Combaret C. 2013. Plant growth-promoting rhizobacteria and root system functioning. *Frontiers in Plant Science*, **4**: 356.

- Vacheron J, Moëgne-Loccoz Y, Dubost A, Gonçalves-Martins M, Muller D & Prigent-Combaret C. 2016. Fluorescent *Pseudomonas* strains with only few plant-beneficial properties are favored in the maize rhizosphere. *Frontiers in Plant Science*, **7**: 1–13.
- Valente J, Gerin F, Le Gouis J, Moëgne-Loccoz Y & Prigent-Combaret C. 2020. Ancient wheat varieties have a higher ability to interact with plant growth-promoting rhizobacteria. *Plant Cell and Environment*, **43**: 246–260.
- Valette M, Rey M, Gerin F, Comte G & Wisniewski-Dyé F. 2020. A common metabolomic signature is observed upon inoculation of rice roots with various rhizobacteria. *Journal of Integrative Plant Biology*, **62**: 228–246.
- Venturi V & Keel C. 2016. Signaling in the Rhizosphere. *Trends in Plant Science*, **21**: 187–198
- Voges M, Bai Y, Schulze-Lefert P & Sattely ES. 2019. Plant-derived coumarins shape the composition of an *Arabidopsis* synthetic root microbiome. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **116**: 12558–12565.
- Walker V, Bertrand C, Bellvert F, Moëgne-Loccoz Y, Bally R & Comte G. 2011. Host plant secondary metabolite profiling shows a complex, strain-dependent response of maize to plant growth-promoting rhizobacteria of the genus *Azospirillum*. *New Phytologist*, **189**: 494–506.
- Weller DM, Landa BB, Mavrodi OV, Schroeder KL, De La Fuente L, Blouin Bankhead, S, Thomashow L S. 2007. Role of 2,4-Diacetylphloroglucinol-Producing Fluorescent *Pseudomonas* spp. in the defense of plant roots. *Plant Biology*, **9**: 4–20.
- Weston L A & Mathesius U. 2013. Flavonoids: their Structure, biosynthesis and role in the rhizosphere, including allelopathy. *Journal of Chemical Ecology*, **39**: 283–297.
- Wolfender J-L, Marti G, Thomas A & Bertrand S. 2015. Current approaches and challenges for the metabolite profiling of complex natural extracts. *Journal of Chromatography A*, **1382**: 136–164.
- Wouters F C, Gershenzon J & Vassão D G. 2016. Benzoxazinoids: Reactivity and modes of action of a versatile class of plant chemical defenses. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, **27**: 1379–1397.
- Wu H, Pratley J, Lemerle D & Haig T. 2001. Allelopathy in wheat (*Triticum aestivum*). *Annals of Applied Biology*, **139**: 1–9.
- Zawadzka AM, Crawford RL & Paszczyński AJ. 2006. Pyridine-2, 6-Bis (Thiocarboxylic Acid) Produced by *Pseudomonas stutzeri* KC reduces and precipitates selenium and tellurium oxyanions. **72**: 3119–3129.
- Zhou S, Richter A & Jander G. 2018. Beyond defense: Multiple functions of benzoxazinoids in maize metabolism. *Plant and Cell Physiology*, **59**: 1528–1533.