



HAL
open science

Impact des compétitions inter-microbiennes médiées par le Système de Sécrétion de Type VI (T6SS) sur la dynamique de transmission du microbiote des graines aux plantules

Tiffany Garin

► To cite this version:

Tiffany Garin. Impact des compétitions inter-microbiennes médiées par le Système de Sécrétion de Type VI (T6SS) sur la dynamique de transmission du microbiote des graines aux plantules. Microbiologie et Parasitologie. Université d'Angers, 2024. Français. NNT : 2024ANGE0008 . tel-04707261

HAL Id: tel-04707261

<https://theses.hal.science/tel-04707261v1>

Submitted on 24 Sep 2024

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

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

THESE DE DOCTORAT

DE
L'UNIVERSITÉ D'ANGERS

SOUS LE SCEAU DE
LA COMUE ANGERS – LE MANS

ECOLE DOCTORALE N° 642

Ecole doctorale Végétal, Animal, Aliment, Mer, Environnement

Spécialité : *Microbiologie - Immunologie*

Par

Tiffany GARIN

**Impact des compétitions inter-microbiennes médiées par le
Système de Sécrétion de Type VI (T6SS) sur la dynamique de
transmission du microbiote des graines aux plantules**

Thèse présentée et soutenue à Angers, le 21 mars 2024

Unité de recherche : IRHS1345 Equipe EmerSys

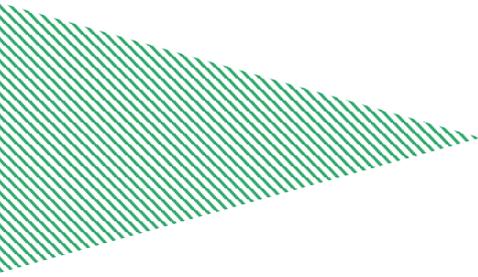
Rapporteurs avant soutenance :

Annabelle MERIEAU Maitre de conférences – Université de Rouen, UMR CBSA

Aurélié DEVEAU Chargée de Recherche – INRAE, UMR IAM

Composition du Jury :

Président :	Thomas GUILLEMETTE	Professeur – Université Angers, UMR IRHS
Examineur :	Ralf KOEBNIK	Directeur de Recherche – IRD, UMR PHIM
Dir. de thèse :	Alain SARNIGUET	Directeur de Recherche – INRAE, UMR IRHS
Co-dir. de thèse :	Matthieu BARRET	Directeur de Recherche – INRAE, UMR IRHS



Partout se trouve la beauté
Dans un marteau, un clou, un cageot, un trait
La beauté est dans l'œil qui contemple
Et qu'importe le sujet observé
L'émerveillement s'apprend et se transmet

Alain Kokor & Pascal Rabaté
Alexandrin ou l'art de faire des vers à pied

Table des matières

Remerciements	I
Liste des abréviations	IV
Liste des figures	VI
Liste des tableaux	IX
Liste des articles	X
CONTEXTE GENERAL	1
I. Contexte scientifique	2
II. Structure de la thèse	5
SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE	6
I. Le microbiote des graines	8
1. Composition.....	10
2. Acquisition	14
a. Voie interne.....	14
b. Voie florale	16
c. Voie externe	17
3. Assemblage	18
a. Processus écologiques impliqués dans l’assemblage du microbiote des graines	18
b. Processus écologiques impliqués dans l’assemblage du microbiote des graines individuelles	19
4. Transmission de la graine à la plantule	21
a. Etudier la transmission du microbiote des graines	21
b. Transmission du microbiote des graines en conditions gnotobiotiques	21
c. Transmission du microbiote des graines en substrat non stérile.....	23
II. Interactions microbiennes	26
1. Coopération	26
a. La division du labeur	26
b. La production de biens publics.....	30
2. Compétition	31
a. Compétition d’exploitation	31
b. Compétition par interférence	31
3. Interactions microbiennes et structuration des communautés.....	35
III. Le système de sécrétion de type VI	38
1. Définition des T6SS	38
a. Des systèmes d’injection contractiles pas comme les autres	38
b. Les différents types de T6SS.....	40

2. Structure des T6SS	42
a. Structure du T6SS canonique (T6SS ⁱ).....	42
b. Structure des T6SS non canoniques (T6SS ^{ii-iv})	51
3. Distribution des T6SS	53
a. Distribution	53
b. T6SS plasmidiques.....	54
c. T6SS chez les bactéries associées aux plantes	56
4. Effecteurs du T6SS	58
a. Chargement des effecteurs.....	58
b. Description des effecteurs et de leurs cibles	60
c. Effecteurs anti-procaryotes.....	61
d. Effecteurs anti-eucaryotes	62
e. Effecteurs interrègne	64
f. Effecteurs impliqués dans l'acquisition des ressources	66
g. Distribution des effecteurs et avantages de la diversité	68
5. Défenses face aux effecteurs du T6SS	72
a. Protéines d'immunité orphelines.....	72
b. Barrières physiques.....	74
c. Séparation spatiale.....	76
d. Réponses aux stress	77
e. Attaquer pour mieux se défendre.....	77
f. Interférence dans la régulation	78
6. Régulation du T6SS	79
a. Facteurs abiotiques.....	79
b. Facteurs biotiques.....	80
7. Rôles du T6SS.....	81
a. Virulence des agents phytopathogènes	81
b. Protection des plantes	83
c. Interactions mutualistes avec les plantes	84
d. Attachement et colonisation.....	84
e. Transferts horizontaux de gènes.....	85
8. T6SS et microbiote des plantes.....	86
IV. <i>Stenotrophomonas rhizophila</i>	88
1. Taxonomie et habitats	88
2. Croissance des plantes.....	89
3. Mécanismes de résistance aux stress abiotiques	90
4. Mécanismes de résistance aux stress biotiques	91
5. <i>Stenotrophomonas rhizophila</i> et T6SS	93
V. Objectifs de la thèse	94

CHAPITRE 1	96
I. Objectifs et stratégies	98
II. Contribution des auteurs	99
III. Résultats	99
IV. Conclusions	119
CHAPITRE 2	122
I. Objectifs et stratégies	124
II. Contribution des auteurs	125
III. Résultats	125
IV. Conclusions	159
DISCUSSION & PERSPECTIVES	160
I. Distribution des T6SS dans le genre <i>Stenotrophomonas</i>	162
II. Le T6SS de <i>S. rhizophila</i> CFBP13503	164
III. L'activité antimicrobienne du T6SS de <i>S. rhizophila</i> CFBP13503	166
IV. L'impact du T6SS de <i>S. rhizophila</i> CFBP13503 sur la structuration des communautés bactériennes <i>in vitro</i>	168
V. Un lien entre compétitions d'interférence médiées par le T6SS et exploitation des ressources ?	169
VI. Le T6SS de <i>S. rhizophila</i> CFBP13503 limite la transmission de <i>X. campestris pv. campestris</i> 8004 de la graine à la plantule de radis	170
VII. L'impact du T6SS sur la transmission du microbiote des graines et l'invasion des bactéries telluriques	171
1. L'utilisation des SynComs pour réussir à normaliser la transmission du microbiote des graines	172
2. L'impact du T6SS de <i>S. rhizophila</i> CFBP13503 sur la dynamique de transmission des communautés bactériennes de la graine à la plantule.	173
3. L'avantage compétitif conféré par le T6SS lors de la transition graine-plantule	173
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	178
ARTICLE ANNEXE	212

Remerciements

Tout d'abord, je souhaite remercier les membres du jury de thèse : **Annabelle MERIEAU**, **Auréli DEVEAU**, **Ralf KOEBNIK** et **Thomas GUILLEMETTE**, d'avoir accepté d'évaluer mes travaux de thèse. Je tiens également à remercier les membres de mon comité de thèse pour m'avoir accompagnée dans mon projet et pour leurs conseils. Merci donc à **Laure JOURNET**, **Céline LAVIRE**, **Natalia GUSCHINSKAYA**, **Marie SIMONIN**, **Ludovic VIAL** et **Martial BRIAND**.

Mince, ces trois années seront vraiment passées vite. Quelle expérience la thèse ! Certes c'est beaucoup de boulot mais c'est aussi un vrai cocktail d'émotions et beaucoup de très belles rencontres. Il y a trois ans, j'ai tout quitté et traversé la France pour vivre cette expérience et grâce à toutes les personnes que j'ai pu rencontrer, elle fût sacrément belle !

Tout a commencé grâce à deux personnes et non pas des moindres, mes encadrants ! Un énorme merci à **Alain** et **Matthieu** de m'avoir donné la chance de vivre tout ça. Merci **Alain** pour tous les échanges scientifiques qu'on a pu avoir, pour ton accompagnement au cours de ces trois années et pour ton humour que tu as su distiller à petites doses mais toujours avec efficacité ! J'ai énormément appris à tes côtés, tant sur la science que sur mon propre fonctionnement. Merci **Matthieu** pour ton soutien et ton énergie communicative. Tu m'as énormément aidée au cours de la dernière année et tu m'as aussi beaucoup rassurée. Merci pour ton soutien et pour la patience dont tu as su faire preuve. Je l'ai fait, enfin !

J'ai fait tellement de belles rencontres pendant ces trois années que je ne saurais par où commencer... Peut être par les premières personnes qui m'ont accueilli après avoir débarqué à Angers : le duo de choc **Coralie** et **Guillaume** ! Je n'aurais pas pu rêver mieux comme guides au cours de ma première année. Deux personnes d'une bienveillance et d'une positivité à toute épreuve. Vous avez posé les meilleures bases qu'on puisse avoir lorsqu'on débarque dans un nouvel endroit. Merci pour tous ces moments de vie qu'on a passés ensemble, des plus simples au cours de nos pauses T, aux plus fous au cours de journées et de soirées endiablées ! Et comment vous citer sans mentionner **Gontran**. Que dis-je ? Dr Gong ! Le meilleur doctorant DJ que je connaisse ! Et je ne dis pas ça parce que je n'en connais qu'un. C'est réellement toujours un plaisir de bouger son petit body au rythme de ta musique. Merci à toi Gontran, à Coralie aussi et à vos deux moitiés respectives, **Manon** et **Mathieu**, pour tous ces moments qu'on a pu vivre : concert, spectacle et jeux en tout genre. J'ai adoré chacun d'entre eux.

Je continue avec l'équipe EmerSys et quelle équipe ! EmerSys c'est une équipe hétéroclite composée de personnes toutes plus différentes les unes que les autres mais qui partagent deux valeurs communes : la bienveillance et l'ouverture d'esprit. Chaque personne qui la constitue sait accepter la différence

chez l'autre et l'accueil avec curiosité et générosité. J'ai adoré travailler et échanger avec chacun d'entre vous.

Merci à **Chrystelle** d'avoir été un binôme de choc pour la construction de tous les mutants de ces travaux de thèse. On a partagé des moments de joie très simples toutes les deux, une colonie suffisait à faire notre bonheur. Mais qu'est-ce qu'on a travaillé pour obtenir cette petite pointe de bonheur !

Merci également à **Anne** qui m'a énormément appris. J'ai adoré tous les moments qu'on a pu passer ensemble, sous la hotte, à discuter sciences et sujets en tout genre. Un énorme merci pour tes conseils et pour toute l'aide que tu m'as apportée

pour les tests de transmission. Je ne comprends toujours pas comment c'est humainement possible de déposer des graines aussi vite dans du papier plissé mais après tout, tu es une technicienne exceptionnelle. Enfin que dis-je, une technicienne légendaire ! Merci pour tout Anne, vraiment.

Un grand merci aussi à **Agathe**. Encore une rencontre magnifique au cours de cette thèse. Merci de t'être démenée pour faire les variants rif et les tests de confrontation. Merci d'être restée avec moi jusqu'à tard pour les manips. Merci pour toutes les discussions qu'on a pu avoir. Merci pour ton soutien, ton écoute et tes rires qui vont assurément beaucoup me manquer. Ils me manquent déjà.

Merci à tous les autres membres de l'équipe, **Marie-Agnès, Sophie B, Tristan, Alba, Cécile, Marion, Perrine, Martial, Armelle, Nico, Marie, Géraldine, Jessica, Sophie C, Brice, Audrey, Stéphanie** et ceux qui sont déjà partis vers d'autres aventures, **Enora, Anne-Sophie, Quentin** et **Damien**. Merci pour tous ces moments partagés autour des innombrables sucreries de la pause de 10h, pendant les pauses repas du midi, les afterworks ou encore les nombreux congrès et séminaires que nous avons pu faire aux quatre coins de la France. La thèse est un travail difficile mais grâce à vous, il n'y a pas un jour où je suis allée au labo à reculons. Peu importe la difficulté rencontrée, vous avez toujours eu une écoute, un conseil ou un rire pour tout rééquilibrer. Mention spéciale à **Christopher** avec qui on a ouvert le bureau des plaintes. Ces moments d'écoute et d'encouragements mutuels autour d'un petit gâteau chocolaté étaient vraiment les bienvenus en cette fin de thèse. Je te souhaite force et courage pour ta dernière année !

Un grand merci aussi à toutes ces nouvelles personnes qui ont débarqué à la fin de mon aventure. Vous m'avez apporté un vent de fraîcheur qui m'a beaucoup aidé pour naviguer sur les derniers mètres de la thèse. Merci **Garion** et **Clara** pour votre humour et votre bonne humeur. Merci aux nouveaux doctorants **Chloé, Louna, Thomas** et **Logan** pour votre sympathie et votre excitation des débuts qui est très communicative. L'aventure commence tout juste pour vous. Profitez-en le plus possible ! Merci aussi aux stagiaires que j'ai pu encadrer, **Charles-Christian** et **Gautier**, pour leur implication dans leur travail. Merci également aux autres stagiaires, **Arthur** et **Téhani** notamment, avec qui j'ai eu l'occasion de passer

de super moments. Merci aussi aux doctorants des autres équipes, **Térance**, **Axelle** ou encore **Romane** avec qui ça a toujours été un plaisir d'échanger. Bon courage à vous pour la fin !

Finalement, on arrive à certainement la plus belle rencontre de cette thèse, la légendaire **Charlotte** ! Ce fût une chance inouïe de vivre cette aventure avec toi. Je ne pense pas qu'on puisse rêver meilleure co-bureau. On a eu des milliers de discussions passionnantes toutes les deux. On a su s'entre-aider, se soutenir, se motiver. Tes petits canelés et tes petits brownies qui remontent le moral vont beaucoup me manquer. Merci infiniment Charlotte d'avoir été là et d'avoir été toi. Si cette aventure a été aussi belle, c'est en très grande partie grâce à toi.

Je voudrais finalement terminer par remercier mes amis et ma famille. Tout d'abord, un grand merci à **Mélanie** avec qui j'ai découvert la microbiologie à la fac. Si tu ne m'avais pas partagé l'annonce de cette thèse en pensant qu'elle pouvait me plaire, je n'aurais jamais vécu tout ça. Ensuite, un énorme merci à mon amoureux **Cédric**, pour m'avoir soutenue dans mon projet de partir pendant trois ans à l'autre bout de la France. Merci infiniment pour ton soutien et pour m'avoir rapatriée et nourrie pendant ces derniers mois de rédaction. Merci à **Bobby** d'être un ami en or et d'être toujours disponible pour les moments d'évasion, que ce soit lors de grands voyages comme à la Réunion ou des plus petits comme à Fougère. Merci à **Noémie**, mon amie d'une vie, pour avoir toujours cru en moi. Et finalement, merci à ma maman, **Sylvie**, qui est la personne la plus exceptionnelle de ma vie. Au cours de cette thèse nous avons eu la chance de vivre pleins de moments géniaux et de partir à la conquête de l'ouest. Merci d'avoir été là et d'avoir partagé tous ces moments d'évasion avec moi.

Je vous souhaite à tous plein de belles choses et encore merci à chacun d'entre vous pour m'avoir accompagnée au cours de cette aventure.

Tiffany

Liste des abréviations

-A-

ACC : Acide 1-aminoCyclopropane-1-Carboxylique

ADN : Acide DésoxyriboNucléique

AIA : Acide IndolAcétique

ANAN : Analyse des Acides Nucléiques

ARN : Acide RiboNucléique

ARNr : Acide RiboNucléique ribosomique

ASV : Amplicon Sequence Variant

-C-

CFBP : Collection Française de Bactéries Phytopathogènes

CFU : Colony Forming Unit

CIS : Contractile Injection System

eCIS : extracellular Contractile Injection System

CT : C-terminal Toxic domain

-E-

EPS : ExoPolySaccharide

ESR : Envelope Stress Response

-G-

GFP : Green Fluorescent Protein

gyrB : *gyrase* B

-H-

Hcp : Heamolysin coregulated protein

HGT : Horizontal Gene Transfert

-L-

LPS : LipoPolySaccharide

-N-

NAD(P) : Nicotinamide Adénine Dinucléotide (Phosphate)

-O-

OmpA : Outer membran protein A

OMV : Outer Membrane Vesicle

-P-

PAAR : Pro-Ala-Ala-aRginine

PDG : PeptiDoGlycane

PGPB : Plant Growth Promoting Bacteria

pH : potentiel Hydrogène

-R-

Rhs : Rearrangment hotspot

-T-

Tag : T6SS accessory gene

Tap : T6SS adaptator protein

TasL : T6SS associated lipoprotein

Tce : T6SS contact-independent antibacterial effector

Tec : T6SS effector chaperone

TeoL : T6SS effector for recruitment of OMV *via* LPS

TepC : T6SS effector for policing Cheaters

Tfe : T6SS antifungal effector

TFT : Tit-For-Tat

TsIA : Type six secretion dynamic localization protein A

TPP : Threonine Phosphorylation Pathway

Tse : Type six effector gene

Tsi : Type six immunity gene

Tss : Type six structural gene

-V-

VgrG : Valine-glycine repeat protein G

Liste des figures

Synthèse bibliographique

- Figure 1.** Cycle de développement de la graine à la graine et sources d'acquisition du microbiote des graines.
- Figure 2.** Composition du microbiote bactérien et fongique des graines.
- Figure 3.** Structure taxonomique des communautés bactériennes et fongiques des habitats associés aux plantes.
- Figure 4.** Colonisation des graines de *Brassica oleracea* par la voie florale par *Xanthomonas campestris pv. campestris* (Xcc).
- Figure 5.** Distribution du microbiote des glands de chêne (*Quercus robur*) lors de la transmission aux plantules.
- Figure 6.** Les différents types d'interaction.
- Figure 7.** Cross-feeding : mécanismes et distribution.
- Figure 8.** Exemples de contrôles mis en place pour limiter l'impact des tricheurs.
- Figure 9.** Corrélation entre la probabilité d'antagonisme et la distance fonctionnelle et métabolique.
- Figure 10.** Exemples de différents types d'armes microbiennes.
- Figure 11.** Représentation schématique et distribution phylogénétique des systèmes d'injection contractiles (CISs).
- Figure 12.** Distributions phylogénétiques des CIS et T6SS.
- Figure 13.** Représentation de la structure du T6SS canonique.
- Figure 14.** Implication des protéines accessoires (Tag) dans la régulation post-traductionnelle du T6SS.
- Figure 15.** Modèle d'assemblage du T6SS dépendant du contact.
- Figure 16.** Modèle prédictif de la coordination de TasL et du T6SS chez *Vibrio fischeri* ES401 dans la sélection des proies en milieu hydrogel.

- Figure 17.** Présence et absence des sous-types de T6SS à travers les différents phyla bactériens.
- Figure 18.** Distribution des T6SS chez les bactéries associées aux plantes.
- Figure 19.** Modes de couplage des effecteurs aux composants structuraux du T6SS.
- Figure 20.** Les classes d'effecteur T6SS et leurs cibles moléculaires.
- Figure 21.** Diversité des PAAR-Rhs-CT chez l'espèce *E. coli*.
- Figure 22.** Représentation schématique du captage des ions métalliques médié par le T6SS.
- Figure 23.** Effecteurs core et effecteurs accessoires associés aux T6SS de *P. aeruginosa*.
- Figure 24.** Graphique de synténie comparant des groupes de gènes T6SS de *S. marcescens* SJC1036, *S. marcescens* Db10 et *S. ficaria* 1D1416.
- Figure 25.** La production d'exopolysaccharides (EPS) comme mécanisme de défense individuel et collectif.
- Figure 26.** La présence de barrières de cellules mortes comme moyen de défense face au T6SS.

Chapitre 1 – Caractérisation du T6SS de *S. rhizophila* CFBP13503 et impact sur la transmission de l'agent phytopathogène *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* 8004

- Figure 1.** *Stenotrophomonas rhizophila* CFBP13503 type VI secretion system (T6SS) genomic architecture.
- Figure 2.** *Stenotrophomonas rhizophila* CFBP13503 type VI secretion system (T6SS) effectors.
- Figure 3.** Bactericidal activity of *Stenotrophomonas rhizophila* CFBP13503 against *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* 8004 (Xcc8004).
- Figure 4.** Bacterial population dynamics during seed-to-seedling transmission of *Stenotrophomonas rhizophila* CFBP13503 and *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* (Xcc8004) in radish.
- Figure 5.** Type VI secretion system (T6SS) distribution among *Stenotrophomonas* sp.
- Figure 6.** Type VI secretion system (T6SS) distribution among *Lysobacteraceae*.

Figure S1. Type VI secretion system (T6SS) distribution among *Stenotrophomonas* sp. Interactive circle packing representation of *Stenotrophomonas* sp. genomes.

Figure S2. Clustering of *Stenotrophomonas* genome sequences. Circle packing representation of *Stenotrophomonas* sp. genomes.

Figure S3. Dynamics of *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* (Xcc8004) and *Stenotrophomonas rhizophila* CFBP13503 populations in confrontation from 0 to 48h.

Figure S4. Bactericidal activity of *Stenotrophomonas rhizophila* CFBP13503 against *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* 8004 (Xcc8004) in liquid medium.

Chapitre 2 – Impact du T6SS sur la structuration de communautés bactériennes synthétiques et sur leur dynamique de transmission de la graine à la plantule

Figure 1. Overview of experimental designs.

Figure 2. T6SS distribution among seed-associated bacteria.

Figure 3. T6SS impact on the structure of bacterial synthetic communities *in vitro*.

Figure 4. Enrichment/depletion of bacteria in the presence of *S. rhizophila* CFBP13503 T6SS and pairwise comparison assays *in vitro*.

Figure 5. Relative abundance of *S. rhizophila* CFBP13503 and SynCom members.

Figure S1. Impact of CFBP13503 T6SS and time on bacterial communities' dynamics.

Figure S2. Changes in strain relative abundance according to their phylogenetic (A) and functional (B) proximity from *S. rhizophila* CFBP13503.

Figure S3. *S. rhizophila* CFBP13503 population dynamics during pairwise confrontation assays.

Figure S4. *S. rhizophila* CFBP13503 T6SS impact on synthetic communities of 5 members *in vitro*.

Figure S5. Estimate richness and β -diversity of bacterial communities during seed-to-seedling transmission.

Figure S6. Bacterial populations during seed-to-seedling transmission.

Liste des tableaux

Synthèse bibliographique

Tableau 1. Résumé des composants structuraux essentiels des T6SS.

Tableau 2. Toxines et effecteurs associés aux H1, H2 et H3-T6SS de *Pseudomonas aeruginosa*.

Chapitre 1 – Caractérisation du T6SS de *S. rhizophila* CFBP13503 et impact sur la transmission de l'agent phytopathogène *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* 8004

Tableau S1. Strains and plasmids used in this study.

Tableau S2. Primers used for type VI secretion system (T6SS) mutant constructions.

Chapitre 2 – Impact du T6SS sur la structuration de communautés bactériennes synthétiques et sur leur dynamique de transmission de la graine à la plantule

Tableau 1. List of non-inoculated taxa affected by the T6SS of CFBP13503 in three microbial environments after seed inoculation with (i) *S. rhizophila* alone (no SC), (ii) *S. rhizophila* and SCA (SCA), (iii) *S. rhizophila* and SCB (SCB).

Tableau S1. Bacterial strains used in this study.

Liste des articles

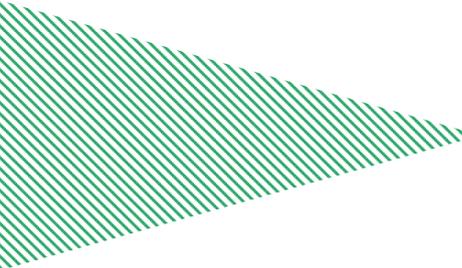
Cette thèse est basée sur les articles suivants. Ces articles sont soit publiés (**Article 1**), soit en préparation (**Article 2**).

Article 1 : Garin, T., Brin, C., Préveaux, A., Brault, A., Briand, M., Simonin, M. et al. (2024) The type VI secretion system of *Stenotrophomonas rhizophila* CFBP13503 limits the transmission of *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* 8004 from radish seeds to seedlings. *Molecular Plant Pathology*, 25, e13412. Available from: <https://doi.org/10.1111/mpp.13412>

Article 2 : Garin, T., A., Brault, Marais, C., Briand, M., Préveaux, A., Simonin, M., Barret, M., & Sarniguet, A. (2023). T6SS-mediated competition by *Stenotrophomonas rhizophila* CFBP13503 shapes seed-borne bacterial communities and seed-to-seedling transmission dynamic. *In prep.*

Au cours de cette thèse, j'ai également participé à la construction de la figure 4 illustrant les analyses de richesses bactériennes et de profil des communautés bactériennes d'un article portant sur la transmission de communautés synthétiques de la graine de radis à la plantule. Cet article porte sur les résultats d'une étude faite en amont de mon projet de recherche et inclut *S. rhizophila* CFBP13503 dans les tests de transmission. J'ai également participé à la rédaction de l'article et aux révisions. L'article est disponible à la fin du manuscrit, dans la partie **ANNEXE**.

Simonin, M., Préveaux, A., Marais, C., Garin, T., Arnault, G., Sarniguet, A., & Barret, M. (2023). Transmission of synthetic seed bacterial communities to radish seedlings: impact on microbiota assembly and plant phenotype. *Peer Community Journal*, 3, e95. Available from: <https://peercommunityjournal.org/articles/10.24072/pcjournal.329/>



CONTEXTE GENERAL

I. Contexte scientifique

Pour la majorité des plantes, la graine constitue le point de départ de leur cycle de vie et souvent aussi, le point final. Au cours de leur développement, les graines acquièrent des microorganismes soit hérités de leur plante parente, soit transmis de leur environnement proche (Shade et al., 2017). Ces microorganismes constituent le microbiote des graines qui s'acquiert et s'assemble tout au long du développement, de la maturation et de la conservation des graines, jusqu'à ce que la graine poursuive un nouveau cycle de vie en germant. Lors de leur germination, les graines relarguent de nombreux composés organiques dans leur environnement immédiat (i.e. spermosphère) (Nelson, 2004). Le relargage d'exsudats va entraîner l'activation métabolique et la multiplication des microorganismes associés aux graines et au sol, ce qui entraîne une forte compétition pour les ressources (Nelson, 2004). Cette compétition intermicrobienne est probablement un moteur essentiel de l'assemblage du microbiote de la future plante en croissance puisque les défenses de l'hôte ne sont pas induites lors de la germination et de la levée des plantules (Darrasse et al., 2010; Nelson, 2018; Ortega-Cuadros et al., 2022). Passée cette étape initiale de coalescence entre les communautés microbiennes des graines et celles du sol, la composition du microbiote des plantes varie ensuite en fonction du génotype de la plante, du stade de développement et de l'organe considéré (Bulgarelli et al., 2013; Chialva et al., 2022; Herrera Paredes and Lebeis, 2016). Les interactions entre les microorganismes, qu'elles soient coopératives ou compétitives, jouent un rôle central dans l'assemblage du microbiote des plantes (Hassani et al., 2018). L'identité et l'abondance des microorganismes qui composent le microbiote des plantes impactent la croissance et la santé des plantes en fonction de la nature des interactions neutres, positives ou négatives établies avec leur hôte (Rodriguez et al., 2019; Trivedi et al., 2020). En tant que source initiale d'inoculum microbien des plantes, le microbiote des graines jouerait un rôle central dans la croissance et la santé des plantes dès les premiers stades de leur développement (Nelson, 2018). Mais quels sont les taxons microbiens transmis à et par les graines ? En quoi peuvent-ils impacter le phénotype de la plante ? Pourquoi les étudier ?

Les microorganismes associés aux graines peuvent impacter positivement la croissance des plantes (Mitter et al., 2017; Walitang et al., 2017). Ils peuvent également protéger la plante de l'établissement d'agents phytopathogènes (Barret et al., 2016; Morella et al., 2019). Certains d'entre eux ont la capacité de se transmettre d'une génération de plante à une autre, qu'ils

soient bénéfiques (Matsumoto et al., 2021) ou pathogènes (Darrasse et al., 2007). La transmission des agents pathogènes a et par les graines favorise l'émergence de maladies dans de nouvelles zones géographiques (Ceresini et al., 2019; Chen et al., 2021; Islam et al., 2016). Un taux de contamination inférieur à 0,2% suffit à déclencher une épidémie (Opio et al., 1993; Roumagnac et al., 2004). Mais comment ces agents phytopathogènes se transmettent-ils aussi efficacement d'une génération de plante à une autre malgré les compétitions intenses entre les microorganismes ?

Depuis quelques années, un mécanisme d'antagonisme bactérien dépendant du contact, le système de sécrétion de type VI (ou T6SS), émerge comme un déterminant clé dans le cycle de virulence de plusieurs agents phytopathogènes (Ceseti et al., 2019; Kim et al., 2020; McAtee et al., 2018; Wang et al., 2021). Ce mécanisme est utilisé par les bactéries Gram-négatives pour injecter des effecteurs toxiques anti-procaryotes et/ou anti-eucaryotes dans des cellules cibles (Jurénas and Journet, 2021; Monjarás Feria and Valvano, 2020). L'agent phytopathogène *Acidovorax citrulli* l'utilise par exemple pour tuer ses compétiteurs et s'établir au sein de la phyllosphère des plantes (Kan et al., 2023). La mutation du T6SS chez cette souche entraîne par ailleurs un défaut de transmission de l'agent phytopathogène lors de la germination des graines de melon (Tian et al., 2015). Ce mécanisme d'antagonisme semble donc jouer un rôle crucial dans la transmission et la persistance des bactéries au niveau de l'habitat plante. Cette supposition est également étayée par la forte prévalence de ce système au sein des bactéries associées aux plantes (Bernal et al., 2018). Étant donné son rôle dans les compétitions inter-microbiennes, nous avons donc fait l'hypothèse que le T6SS pourrait jouer un rôle clé dans l'assemblage et la transmission du microbiote des graines et que l'utilisation d'un tel système par les bactéries commensales ou bénéfiques pourrait permettre de limiter la transmission des agents pathogènes lors de la transition graine-plantule.

Afin de répondre à cette hypothèse, nous avons étudié une bactérie isolée du microbiote des graines de radis, *Stenotrophomonas rhizophila* CFBP13503. Cette bactérie appartient à une espèce bactérienne très prévalente au niveau du microbiote des graines, étant détectée chez plus de 12 espèces de plantes (Simonin et al., 2022). Lorsque *S. rhizophila* CFBP13503 est inoculée avec des consortia bactériens sur des graines de radis, elle se transmet très efficacement aux plantules en condition gnotobiotique (sans sol) (Simonin et al., 2023). De plus, elle est capable d'inhiber la croissance de *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* (Xcc), un

agent phytopathogène transmis par les semences et responsable de pertes de rendement pouvant atteindre 50 à 60% chez différentes espèces de Brassicacées (Singh et al., 2018; Torres-Cortés et al., 2019). Le séquençage du génome de *S. rhizophila* CFBP13503 a révélé la présence d'un cluster T6SS chez cette souche. Ces prérequis nous incitent donc à poser les questions suivantes :

- Est-ce que le T6SS de *S. rhizophila* CFBP13503 exerce une activité d'antibiose de contact *via* son T6SS vis-à-vis de la bactéries phytopathogène *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* ? Est-ce que cette antibiose médiée par le T6SS peut limiter la transmission de Xcc de la graine à la plantule ?
- Est-ce que les compétitions inter-bactériennes médiées par le T6SS de *S. rhizophila* CFBP13503 influencent la dynamique de structuration de communautés bactériennes synthétiques ? Est-ce qu'elles influencent la transmission du microbiote du sol et celui de la graine ? Est-ce qu'elles favorisent la transmission de *S. rhizophila* CFBP13503 elle-même ?

II. Structure de la thèse

La première partie du manuscrit consiste en une synthèse bibliographique décrivant le microbiote des graines, sa composition, son assemblage et les processus écologiques impliqués dans sa transmission à la plantule. Ensuite, les différents types d'interactions microbiennes impliquées dans l'assemblage des communautés microbiennes sont présentés avant de décrire plus en détail le T6SS, ses origines, sa structure, les effecteurs qui lui sont associés, ses rôles, sa régulation et les mécanismes de défense mis en place pour résister à ses attaques. Puis, l'espèce *Stenotrophomonas rhizophila* est présentée afin de replacer notre modèle d'étude dans un contexte plus large. Finalement, les hypothèses et questions de recherche seront rappelées et détaillées.

La seconde partie du manuscrit est composée de deux chapitres correspondant aux deux hypothèses soulevées dans cette thèse. Chaque chapitre est présenté sous la forme d'un article scientifique qui est soit accepté (**chapitre 1**), soit en préparation (**chapitre 2**).

- Le **chapitre 1** décrit le T6SS de *S. rhizophila* CFP13503 et répondra aux questions quant à son implication dans l'antibiose par contact de *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* et les conséquences de cette antibiose dans la transmission de l'agent phytopathogène de la graine à la plantule.
- Le **chapitre 2** évalue le spectre de cibles du T6SS de *S. rhizophila* CFBP13503, l'impact du T6SS sur la structuration de communautés bactériennes synthétiques et finalement son influence sur la transmission du microbiote des graines, des bactéries telluriques et de *S. rhizophila* CFBP13503 elle-même à la plantule.

La dernière partie du manuscrit porte sur la discussion générale des résultats obtenus et des perspectives envisagées pour répondre aux questions de recherche soulevées.

SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE

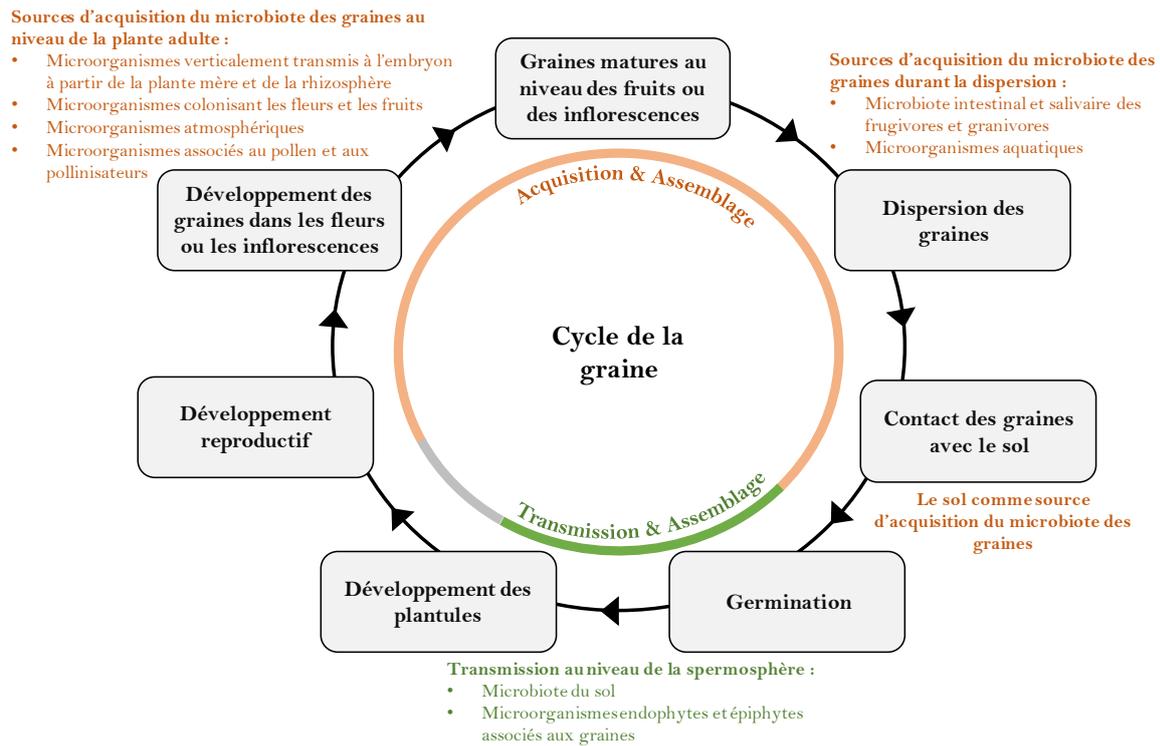


Figure 1. Cycle de développement de la graine à la graine et sources d'acquisition du microbiote des graines. Figure modifiée et traduite de la revue de Nelson (2018).

I. Le microbiote des graines

Les **graines** sont les structures de reproduction des plantes à fleurs (angiospermes) et des plantes à graines nues (gymnospermes). Elles sont formées à partir des ovules, dans les ovaires des fleurs, après la pollinisation et la fécondation. Lors de la **pollinisation**, le pollen, porteur des gamètes mâle, est transféré des étamines aux stigmates par le vent, les insectes ou les oiseaux. La **fécondation** intervient lorsque le pollen germe et forme un tube pollinique qui atteint l'ovule. La fusion des gamètes mâle et femelle donne naissance à l'embryon, amorçant ainsi le développement de la graine. Au fur et à mesure que la graine se développe, un tissu nutritif appelé endosperme entoure l'ovule fécondé, fournissant des éléments nutritifs à l'embryon en croissance. Les enveloppes de la graine, appelées téguments, se forment pour protéger l'embryon. Durant la phase de maturation, la graine continue de se développer dans l'ovaire de la fleur, subissant des changements métaboliques et accumulant des réserves nutritives. La maturité de la graine marque le début de sa **dispersion** vers de nouveaux environnements. Cette dispersion peut se faire de diverses manières, telles que par le vent, l'eau et les animaux. La graine reste en état de dormance jusqu'à ce qu'elle rencontre un environnement propice à sa **germination**. A ce moment-là, la graine absorbe de l'eau, l'embryon se développe activement et la plantule émerge.

De leur formation à leur germination, les graines sont exposées à une diversité de microorganismes provenant de la plante mère et de différentes sources environnementales (**Figure 1**). Ces microorganismes, comprenant des bactéries, des champignons et d'autres organismes, interagissent entre eux et s'assemblent en communautés complexes pour former le **microbiote des graines**. Le microbiote des graines constitue la source d'inoculum initiale de l'assemblage du microbiote de la future plante. Il peut jouer un rôle significatif dans la santé et la croissance des plantes en influençant des processus clés tels que la germination, le développement des racines et la résistance aux agents pathogènes.

L'exploration du microbiote des graines soulève des questions fondamentales sur la diversité des microorganismes qui le composent et sur les mécanismes qui régissent leur acquisition, leur assemblage, et leur transmission à la plantule. Qui sont les microorganismes qui composent le microbiote des graines, et comment cette composition varie-t-elle en fonction des plantes hôtes et de leur environnement ? Comment les graines acquièrent-elles

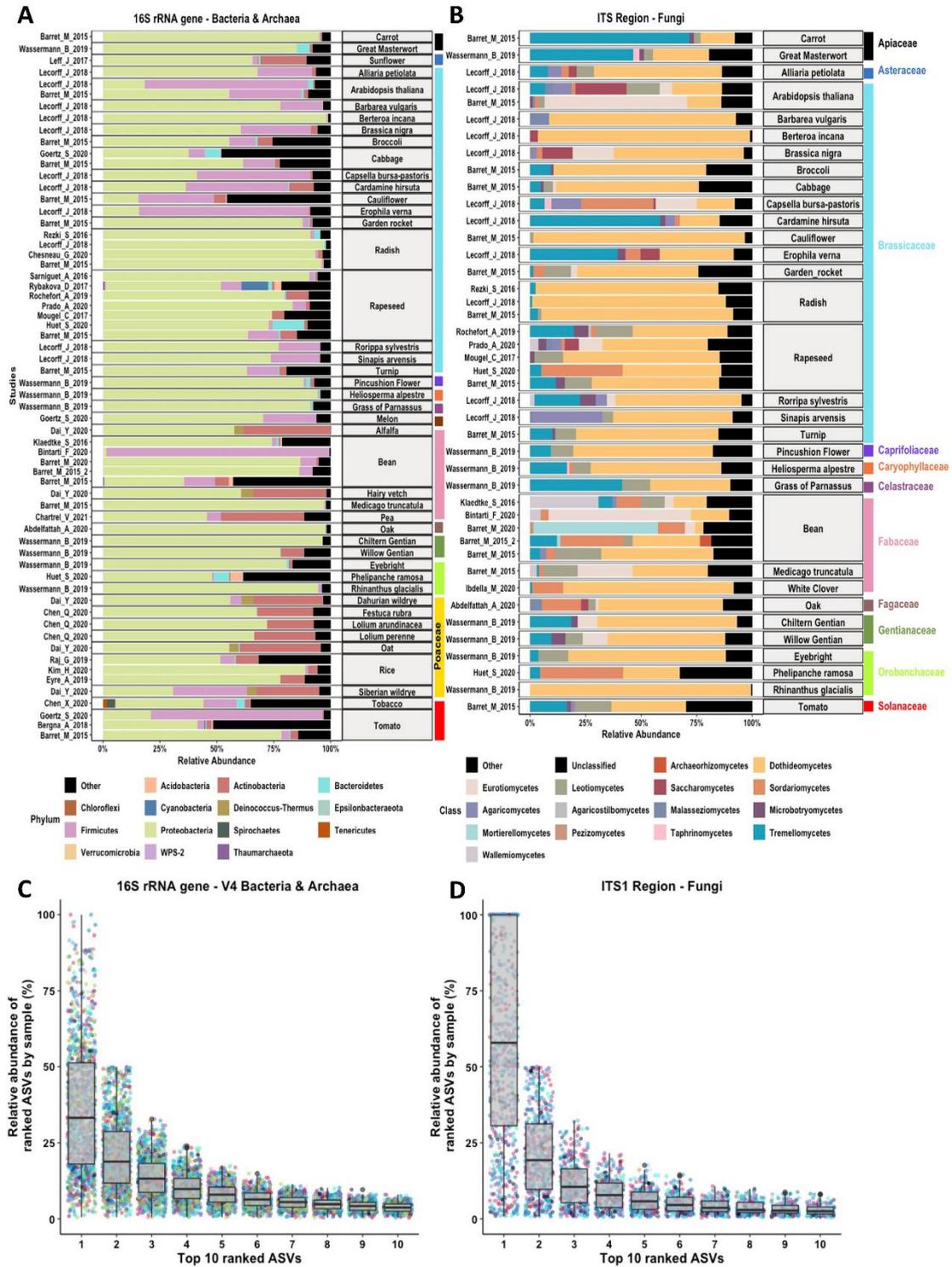


Figure 2. Composition du microbiote bactérien et fongique des graines. Abondance relative moyenne (A) des phyla bactériens (région rRNA 16S-V4) et (B) classes fongiques (région ITS1) majeurs détectés dans le microbiote des graines de 44 espèces végétales appartenant à 13 familles botaniques distinctes. Les espèces de plantes sont ordonnées en fonction de la famille botanique, des *Apiaceae* en haut aux *Solanaceae* en bas. (C-D) Abondance relative des 10 ASV les mieux classés par échantillon pour la communauté procaryote (C ; n = 1182 échantillons) et la communauté fongique (D ; n = 850 échantillons). Chaque point représente un échantillon et est coloré en fonction de l'espèce végétale. D'après la méta-analyse de Simonin et al. (2022).

initialement leur microbiote, et quelles sont les principales sources d'acquisition des microorganismes qui le constituent ? Quels processus biologiques et environnementaux influencent la diversité et l'assemblage du microbiote des graines ? Comment se transmet-il de la graine à la plantule ? Est-il réellement une source importante de microorganismes pour la future plante en développement ?

1. Composition

Le microbiote des graines est composé de divers microorganismes tels que des bactéries, des champignons, des oomycètes, des protistes, des archées ou encore des virus (Sastry, 2013; Simonin et al., 2022; Taffner et al., 2020; Thines, 2014). Depuis quelques années et avec l'essor des outils de séquençage à haut débit, la composition et la diversité du microbiote des graines commencent à être de mieux en mieux caractérisées. Toutefois, cette caractérisation demeure inégalement répartie entre les différents groupes taxonomiques qui composent le microbiote des graines. En effet, les amorces communément utilisées pour le séquençage d'amplicon (ou métabarcoding) négligent les oomycètes, les protistes et les virus, et ne caractérisent que partiellement les archées. Ainsi, parmi les microorganismes associés aux graines, ce sont les composantes bactériennes et fongiques qui sont les mieux caractérisées.

Récemment, une méta-analyse menée par Simonin et al. (2022) a consolidé les résultats de 63 études portant sur le microbiote des graines, englobant ainsi 50 espèces végétales provenant de 14 familles botaniques distinctes (**Figure 2. A-B**). La diversité du microbiote des graines a été estimée par des approches de métabarcoding en utilisant une portion des gènes 16S rRNA ou *gyrB* pour les communautés bactériennes et les régions ITS pour les communautés fongiques (Simonin et al., 2022). Leurs résultats révèlent que le microbiote des graines est très diversifié, avec une richesse microbienne (bactéries + champignons) médiane de 100 ASVs (« Amplicon Sequence Variants ») par lot de graines. Cette diversité se manifeste généralement par des proportions équilibrées de diversité bactérienne et fongique, bien que ces proportions puissent varier considérablement entre et au sein d'une même espèce végétale. Par exemple, certaines espèces de *Brassicaceae* comme le radis sont largement dominées par des taxons fongiques tandis que d'autres, comme le chou-fleur, ont une dominance procaryote (Simonin et al., 2022). Les communautés bactériennes et fongiques sont généralement sous l'influence d'un

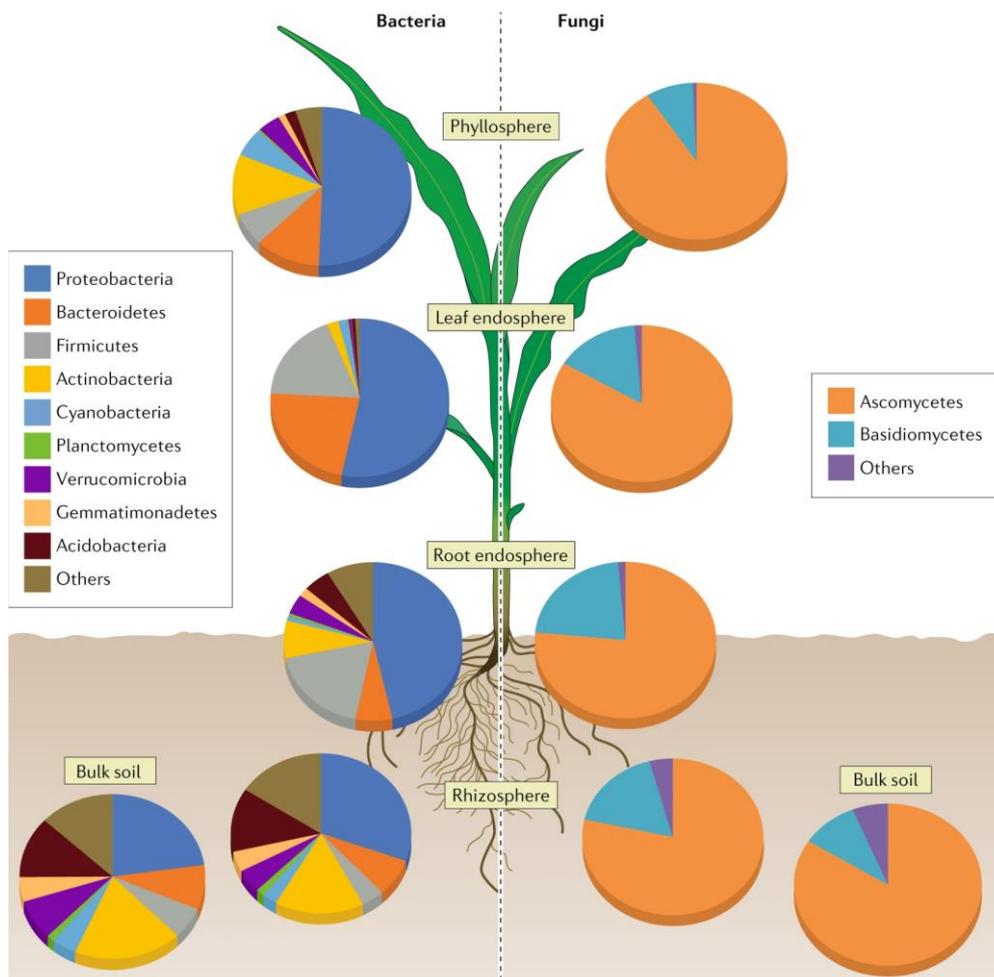


Figure 3. Structure taxonomique des communautés bactériennes et fongiques des habitats associés aux plantes. La composition du microbiote varie en fonction du compartiment végétal. Les graphiques circulaires montrent les moyennes des abondances relatives des principaux phyla bactériens (à gauche) et fongiques (à droite) détectés dans le sol, la rhizosphère, l'endosphère des racines, l'endosphère des feuilles et la phyllosphère de différentes espèces végétales (canne à sucre, raisin, espèces de cactus (*Myrtillocactus geometrizans* et *Opuntia robusta*) et espèces d'Agave (*A. tequilana*, *A. salmiana* et *A. deserti*)). Les abondances relatives ont été estimées par séquençage des marqueurs 16S rARN (pour les bactéries) et ITS1 (pour les champignons). Seuls les phyla qui représentent plus de 0,5 % de la population totale dans au moins un échantillon sont inclus. D'après Trivedi et al., 2020.

ASV prédominant, dont l'abondance relative moyenne atteint respectivement 33% et 58% (**Figure 2. C-D**). L'identité de ce taxon dominant varie en fonction du lot de graines analysé (Simonin et al., 2022).

En considérant l'ensemble des ASVs détectés au niveau des microbiotes des graines, la majorité (64% pour les procaryotes et 58% pour les champignons) sont détectés au niveau d'une seule espèce de plante, dans un nombre limité d'échantillons et avec une faible abondance. Ces taxons constituent la composante variable du microbiote des graines, désignée comme le « microbiote flexible ». A l'inverse, certains ASVs bactériens et fongiques sont très prévalents et détectés dans plus de 20 espèces végétales différentes, généralement avec une abondance élevée. Ces taxons peuvent être considérés comme une composante stable du microbiote des graines ou « microbiote core » (Shade and Handelsman, 2012; Simonin et al., 2022).

Pour la part bactérienne, les ASVs détectés sont distribués en quatre phyla majoritaires : *Pseudomonadata* (ex *Proteobacteria*), *Actinobacteria*, *Firmicutes* et *Bacteroidetes*. A un niveau taxonomique inférieur, six genres bactériens sont fréquemment détectés dans les lots de graines, chez plus de 20 espèces végétales : *Pantoea*, *Pseudomonas*, *Rhizobium*, *Sphingomonas*, *Methylobacterium* et *Paenibacillus*. Pour la composante fongique, l'analyse révèle la présence de cinq classes dominantes et prévalentes : *Dothideomycetes*, *Leotiomycetes*, *Microbotryomycetes*, *Sordariomycetes* et *Tremellomycetes* (**Figure 2. A-B** ; Simonin et al., 2022). Ces différents taxons bactériens et fongiques sont également fréquemment détectés dans d'autres compartiments de la plante telles que la phyllosphère, les racines et la rhizosphère, ainsi que dans le sol environnant (**Figure 3** ; Trivedi et al., 2020). Cette ubiquité souligne l'influence étendue de ces microorganismes au sein de l'écosystème végétal.

Une caractéristique importante du microbiote des graines est la forte variabilité de composition taxonomique entre lots de semences issus d'une même espèce végétale (Simonin et al., 2022). Cette variabilité peut être influencée par le génotype des plantes ainsi que par les régions géographiques dans lesquelles elles ont été cultivées (Klaedtke et al., 2016; Rochefort et al., 2019).

Une autre particularité associée à la caractérisation du microbiote des graines est la méthode d'échantillonnage, qui repose souvent sur des lots de 10 à 1000 graines. Si cette méthode permet d'obtenir suffisamment de matrice pour réaliser les amplifications des gènes ciblés en

métabarcoding et éviter les contaminations, elle surestime la diversité microbienne et sous-estime les dissimilarités entre les échantillons (Kim et al., 2023; Simonin et al., 2022).

Les rares études ayant analysé la composition taxonomique du microbiote à l'échelle de la graine individuelle ont révélé une grande variabilité de richesse en espèces bactériennes entre individus, avec par exemple 2 à 28 ASVs par gland de chêne et 1 à 50 ASVs par graine de haricot et de radis (Abdelfattah et al., 2021; Chesneau et al., 2022). L'abondance des taxons bactériens et fongiques varie également grandement entre les graines. Au niveau du riz par exemple, les *Gammaproteobacteria* (1.68 à 89.9%), *Alphaproteobacteria* (0.6 à 60%), *Actinobacteriota* (0.06 à 54.2%), et *Firmicutes* (0.04 à 30.0%) sont dominants, mais leurs abondances présentent des variations importantes d'une graine à l'autre. Il en va de même pour la communauté fongique avec les *Dothideomycetes* (11.2 à 99.2%), *Ustilaginomycetes* (0.05 à 85.1%), et *Sordariomycetes* (0.01 à 58.4%) (Kim et al., 2023). Ainsi, si le microbiote de chaque graine semble être dominé par un taxon majoritaire, l'identité de ce taxon dominant est très variable d'une graine à l'autre (Chesneau et al., 2022).

Ces variations dans l'identité des taxons dominants, ainsi que plus largement dans la diversité des espèces observées au sein des graines individuelles d'une même espèce végétale, voire d'une même plante, posent des questions sur l'impact des voies d'acquisition et des processus d'assemblage qui régissent la structuration du microbiote des graines.

2. Acquisition

Tout au long de son cycle de vie (i.e. de sa formation à sa germination), la graine peut acquérir des microorganismes à partir de 3 voies d'acquisition principales : interne, florale et externe (Maude, 1996; Shade et al., 2017). La localisation des microorganismes au sein de la graine en développement varie selon les voies empruntées et l'espèce végétale considérée. Certains microorganismes peuvent être présents à l'intérieur des tissus de la graine, notamment à la surface de l'embryon (axe embryonnaire et cotylédons) ou dans les tissus de stockage (endosperme et péricarpe). D'autres sont localisés à l'extérieur de la graine au niveau de l'enveloppe.

a. Voie interne

La voie interne est empruntée par les microorganismes transmis à partir des tissus de la plante mère, notamment à partir des tissus vasculaires comme le xylème. Ce dernier assure le transport de la sève brute vers les organes de la plante tels que les fleurs ou les fruits, où se développent les graines. Ainsi, les microorganismes colonisant le xylème peuvent être transmis aux graines en développement. Au niveau de la vigne par exemple, des *Bacillus* spp. ont été détectés et visualisés au niveau du xylème des ovules et de la pulpe des fruits, ainsi que le long des parois cellulaires à l'intérieur des graines (Compant et al., 2011). Ces observations laissent fortement suggérer que ces *Bacillus* spp. utilisent la voie interne, se transmettant systématiquement du xylème des ovules aux graines en développement.

Les microorganismes empruntant la voie interne sont généralement transmis verticalement d'une génération de plante à une autre. La voie interne peut également être empruntée par les microorganismes qui colonisent tardivement les tissus de la plante et qui ne proviennent pas de la génération précédente. Par exemple, des agents pathogènes comme les *Xanthomonas* sont capables de coloniser les tissus internes des feuilles en entrant par les hydathodes. Ces bactéries peuvent ensuite coloniser les tissus vasculaires de la plante comme le xylème et se transmettre au niveau des graines de la génération suivante (Darrasse et al., 2007).

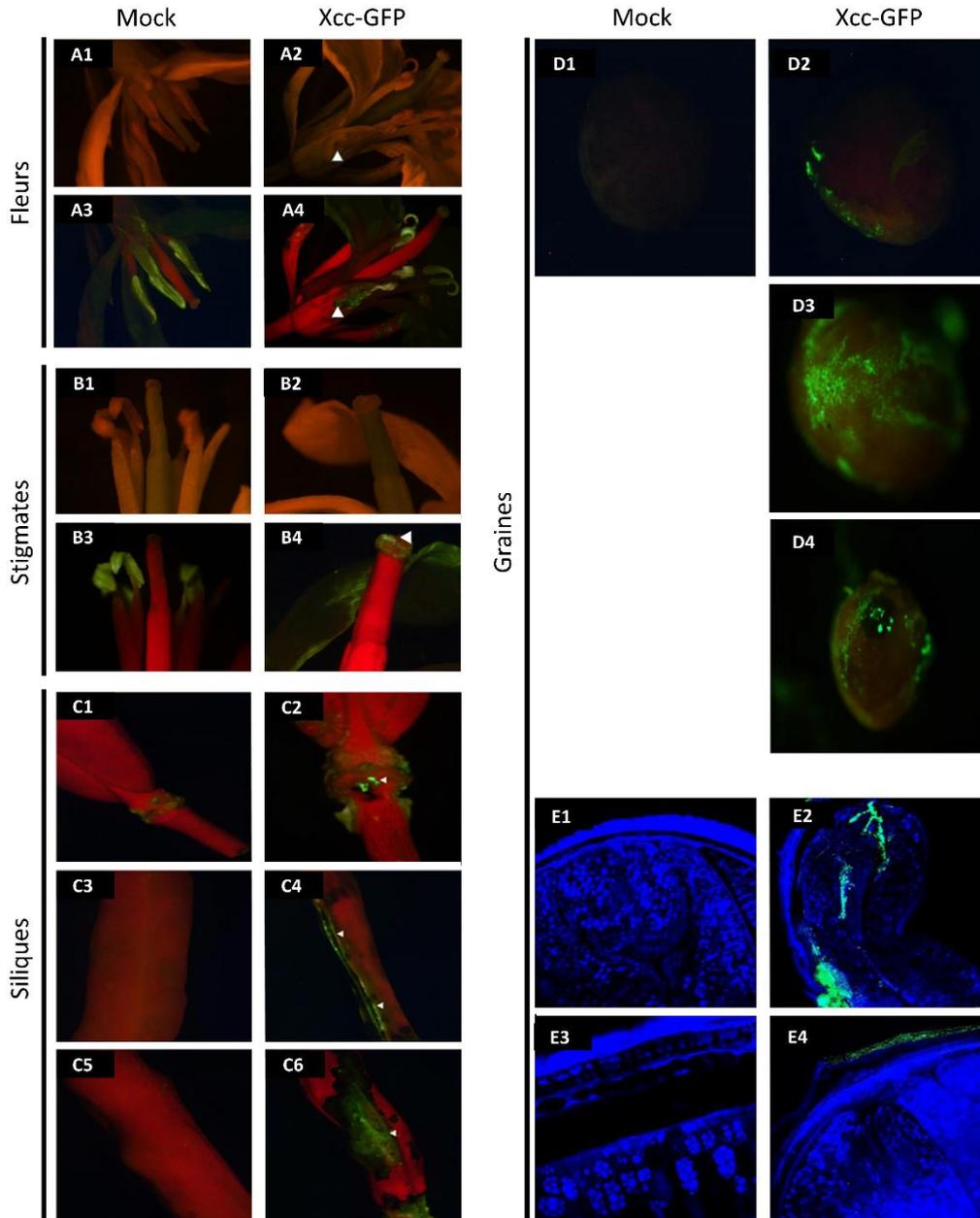


Figure 4. Colonisation des graines de *Brassica oleracea* par la voie florale par *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* (Xcc). Photomicrographie en épifluorescence des fleurs (A), stigmates (B) et siliques (C) de *B. oleracea* après inoculation par spray d'une souche de Xcc marquée à la GFP (panel de droite) au niveau des fleurs. Les triangles blancs indiquent la présence de Xcc. (D) Photomicrographie en épifluorescence de graines provenant (D1) d'une silique d'une plante inoculée avec de l'eau et (D2-3) d'une silique issue de l'inoculation florale de Xcc-GFP. (E) Photomicrographies confocales à balayage laser de sections transversales de graines provenant d'une silique d'une plante inoculée avec de l'eau (panel de gauche) et d'une silique symptomatique à la suite de l'inoculation des fleurs avec Xcc-GFP (panel de droite). Tirée des travaux de van der Wolf et al. (2019)

b. Voie florale

La voie florale est empruntée lorsque les microorganismes colonisent le stigmate de la fleur, puis sont transportés vers la graine en développement. Les principaux vecteurs de microorganismes contribuant à cette voie sont l'eau, l'air et les pollinisateurs. Par exemple, les mouches bleues (*Calliphora vomitoria*) artificiellement contaminées avec *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* (Xcc) sont capables de transmettre efficacement cette bactérie au niveau des fleurs, ce qui entraîne un fort taux de contamination des graines de *Brassica oleracea* (Van Der Wolf and Van Der Zouwen, 2010). Xcc est un agent phytopathogène qui se transmet très efficacement par voie florale (van der Wolf et al., 2019). Lorsqu'elle est inoculée par spray au niveau des fleurs de *B. oleracea*, elle colonise et se multiplie au niveau des stigmates (**Figure 4. A-B**). Elle se transmet ensuite efficacement aux siliques (**Figure 4C**), puis aux graines en développement, où elle colonise à la fois la surface externe et les tissus internes (**Figure 4. D-E**).

La voie florale participe à la transmission horizontale des microorganismes à partir de l'environnement extérieur. Elle pourrait également participer à la transmission verticale des microorganismes transmis à partir du pollen de la plante paternelle. Par exemple, *Enterobacter cloacae* est une bactérie détectée au niveau de grains de pollen stérilisés en surface de plusieurs espèces de pins méditerranéens et l'isolement de cette même espèce bactérienne au niveau des ovules fertilisés de *P. brutia* suggère une transmission verticale d'*Enterobacter* spp. via le pollen (Madmony et al., 2005).

La part des microorganismes transmis par voie florale au niveau des graines diffère en fonction des espèces végétales et de leur type de pollinisation. En analysant le microbiote des bourgeons, fleurs, fruits et graines à différents stades de développement chez le haricot et le radis, Chesneau et al. (2020) ont montré que 36% du microbiote bactérien des graines de radis étaient également détectés au niveau des organes reproducteurs, tandis que pour le haricot, seulement 10% semblaient provenir de ces structures végétales (Chesneau et al., 2020). Plus d'un tiers du microbiote des graines de radis provient donc de la voie florale contre un dixième pour les graines de haricot. Ces différences peuvent être expliquées par les modes de fertilisation distincts entre les deux espèces. Dans le cas du haricot, la pollinisation est principalement autogame. De plus, la fécondation se produit avant que les fleurs ne s'ouvrent.

Le radis, lui, est allogame et sa fécondation dépend des pollinisateurs tels que les insectes (Chesneau et al., 2020).

c. Voie externe

La voie externe est caractérisée par un contact direct entre la graine et les microorganismes présents dans l'environnement proche, tel que l'eau, le sol, l'air, les animaux, les fruits et les résidus de culture. Cette voie est le siège d'interactions intenses entre les microorganismes environnementaux et les graines en développement et contribue à enrichir la diversité du microbiote des graines (Chesneau et al., 2020).

3. Assemblage

a. Processus écologiques impliqués dans l'assemblage du microbiote des graines

L'assemblage des communautés microbiennes fait intervenir quatre processus écologiques principaux : i) la dispersion, ii) la dérive écologique, iii) la sélection et iv) la diversification (Nemergut et al., 2013; Vellend, 2010). La **dispersion** est un processus aléatoire qui se définit par les mouvements des microorganismes dans l'espace (Vellend, 2010). Elle peut résulter de mouvements passifs, tels que le transport par le vent, l'eau ou des macro-organismes. Par exemple, l'un des processus impliqués dans l'assemblage du microbiote des graines est la dispersion passive des microorganismes résultant de la pollinisation par les insectes, tels que les abeilles (Prado et al., 2020). Lorsque les insectes butinent les fleurs, ils peuvent transférer des microorganismes d'une fleur à l'autre, favorisant ainsi la dispersion des microorganismes au niveau des graines. Chez le colza, la pollinisation par les abeilles réduit significativement la diversité du microbiote des graines mais augmente la variabilité du microbiote des graines entre différentes plantes (Prado et al., 2020). La **dérive écologique** est un autre processus écologique impliqué dans la structuration des communautés. Elle engendre des changements aléatoires dans l'abondance relative des organismes au sein d'une communauté, indépendamment de leur valeur adaptative (Vellend, 2010). Les organismes en faible abondance sont plus vulnérables aux effets de la dérive, car de légères variations dans leur abondance peuvent entraîner leur extinction à l'échelle locale. La dérive écologique est par exemple impliquée dans la structuration du microbiote bactérien des graines de radis (Rezki et al., 2018). La **sélection** correspond aux changements dans la structure des communautés causés par des différences de fitness ou de valeur adaptative entre les individus (Vellend, 2010). Les facteurs abiotiques (i.e. environnement) et biotiques (i.e. interaction avec l'hôte et les autres microorganismes) peuvent jouer un rôle prépondérant dans la sélection des microorganismes au sein des communautés. La sélection par l'hôte est, par exemple, un processus déterminant au niveau du colza où le génotype de l'hôte exerce une influence significative sur l'assemblage du microbiote des graines (Rocheffort et al., 2019). La sélection résultant des interactions microbiennes peut également jouer un rôle important sur la structuration du microbiote des graines. Par exemple, la transmission du champignon *Alternaria brassicicola* aux graines de radis modifie la composition taxonomique des communautés fongiques des graines (Rezki et al., 2016). Finalement, le dernier processus

écologique pouvant jouer un rôle dans l'assemblage est la **diversification** (ou spéciation) qui est le résultat de changements évolutifs progressifs au sein des populations d'organismes (Vellend, 2010). Bien que les microorganismes aient la capacité d'évoluer rapidement en raison de leur petite taille, de leurs taux de reproduction élevés et de la possibilité d'échanger des gènes par transfert horizontal, la formation de nouvelles espèces microbiennes reste un processus évolutif qui s'étale sur de longues périodes. À ce jour, aucune étude n'a montré d'impact direct de la diversification dans l'assemblage du microbiote des graines.

b. Processus écologiques impliqués dans l'assemblage du microbiote des graines individuelles

Quelques études se sont intéressées aux processus écologiques impliqués dans l'assemblage du microbiote de graines individuelles (Chesneau et al., 2022; Kim et al., 2023). Chesneau et al. (2022) ont étudié la dynamique d'assemblage du microbiote des graines de radis et de haricot au cours de leur développement. Leur étude révèle que la sélection joue un rôle prépondérant dans l'assemblage du microbiote des graines de haricot. En effet, la similarité phylogénétique entre les communautés bactériennes des graines de haricot dépasse les attentes aléatoires, ce qui indique une influence significative de la sélection. Cependant, pour les communautés bactériennes associées aux graines de radis, il semble que la sélection a moins d'impact, du moins aux stades précoces de développement. Au cours des premiers stades de développement, la structure du microbiote des graines de radis est principalement expliquée par la dérive écologique. Cependant, à des stades ultérieurs, la sélection prend le relais en tant que moteur principal de l'assemblage du microbiote des graines (Chesneau et al., 2022). Dans le cas du haricot et du radis, la sélection, par l'environnement et les interactions biotiques, joue donc un rôle significatif sur l'assemblage du microbiote des graines au cours de leur développement. Dans leur étude récente sur le riz, Kim et al. (2023) ont étudié les mécanismes écologiques sous-jacents aux variations de composition du microbiote entre différentes graines issues de la même plante. Leurs résultats ont mis en évidence que les graines provenant de la même branche partagent des compositions microbiennes similaires, par rapport à celles issues de branches distinctes. Ces variations dans la composition bactérienne du microbiote des graines sont principalement expliquées par deux facteurs : la sélection, qui contribue à hauteur de 59%, et la dérive écologique, qui représente 23% de la variance. Cependant, il est important

de noter que ces processus écologiques n'affectent pas uniformément tous les groupes phylogénétiques bactériens. Par exemple, la sélection exerce une influence marquée sur les Enterobacterales (85,7%) et *Rhizobiaceae* (69,4%), tandis que la dérive écologique joue un rôle prédominant chez les *Sphingomonadaceae* (75%). En ce qui concerne le microbiote fongique, les variations observées sont principalement dues à la dérive écologique (61%) et à une dispersion limitée (24%). Cependant, certains groupes taxonomiques, tels que les *Neosetophoma*, sont influencés par la sélection (61%). En résumé, ces résultats mettent en évidence l'impact significatif de l'environnement, des interactions biotiques, ainsi que de la dynamique aléatoire des espèces dans l'assemblage du microbiote des graines de riz (Kim et al., 2023).

En conclusion, les graines acquièrent leur microbiote par trois voies d'acquisition distinctes (interne, florale, externe) qui dépendent à la fois des microorganismes impliqués et de l'espèce végétale considérée. Ces voies suivies par les microorganismes déterminent s'ils colonisent la graine précocement ou tardivement et influencent en partie leur localisation au niveau de la graine. L'assemblage du microbiote est un processus dynamique qui évolue en fonction de l'étape de développement de la graine et est régi par des processus neutres comme la dispersion et la dérive écologique mais aussi par des processus déterministes comme la sélection. Cette sélection peut être le résultat de divers facteurs, notamment la capacité des microorganismes à surmonter les défenses de la plante hôte, à utiliser efficacement les ressources nutritives allouées, à résister à la dessiccation ou à prospérer dans des environnements pauvres en nutriments. De plus, les interactions entre les microorganismes eux-mêmes, comme leur capacité à attaquer ou à se défendre pour maintenir leur territoire et leurs ressources, peuvent également jouer un rôle dans cet assemblage.

4. Transmission de la graine à la plantule

Les microorganismes associés aux graines ne sont pas systématiquement transmis aux plantules. Une étude bibliographique récente a répertorié 300 agents phytopathogènes associés aux semences. Cependant, seulement 125 d'entre eux ont la capacité de se transmettre à la plantule (Denancé and Grimault, 2022).

a. Etudier la transmission du microbiote des graines

La transmission du microbiote des graines à la plantule peut être évaluée (i) en conditions gnotobiotiques afin de limiter les sources de contaminations extérieures ou (ii) avec un substrat de culture pour estimer l'impact des processus de coalescence entre les différentes communautés microbiennes. Cette étape de transmission peut être analysée au sein des communautés natives des graines ou bien en inoculant des communautés synthétiques (SynComs) afin de limiter la variabilité de composition du microbiote entre les graines individuelles.

b. Transmission du microbiote des graines en conditions gnotobiotiques

Une tentative de suivi temporel du microbiote des graines pendant la germination et la levée des plantules a été entreprise sur des radis et des haricots (Chesneau et al., 2022). Dans cette étude, le microbiote des graines ainsi que sa transmission ont été analysés au moyen de méthodes non destructives, dans le but de suivre spécifiquement la transmission du microbiote des graines au sein d'un même individu. Pour ce faire, les graines ont d'abord été macérées dans une solution saline avant d'être placées en germination dans des conditions axéniques. La diversité bactérienne de la fraction collectée lors de la macération (i.e. microbiote des graines) a ensuite été comparée à celle des plantules (i.e. microbiote des plantules). Les résultats ont révélé que le taxon dominant au sein du microbiote des graines n'était en général pas le taxon dominant du microbiote des plantules, suggérant l'implication de processus sélectifs lors de la transmission (Chesneau et al., 2022). Le faible taux de transmission des taxons dominant aux plantules peut néanmoins être expliqué par l'effet de la macération. Des approches par déploiement de SynComs sur graine de radis ont toutefois confirmé que l'abondance sur graine n'était pas un bon indicateur de l'abondance sur les plantules (Simonin et al., 2023). Une autre

étude, menée en condition stérile, s'est intéressée à la transmission des communautés bactériennes et fongiques endophytes des glands de chênes et à la distribution des taxons au niveau des plantules à la suite de cette transmission (Abdelfattah et al., 2021). En analysant le microbiote associé à chaque compartiment, cette étude a permis de mettre en évidence que l'embryon des glands et la phyllosphère des plantules ont une composition et une diversité en espèces bactériennes et fongiques similaires, tandis que le péricarpe des glands et les racines présentent des communautés distinctes et moins diversifiées (Abdelfattah et al., 2021). Les microorganismes associés aux graines peuvent donc se transmettre à différents compartiments de la plantule avec des associations préférentielles en fonctions de la localisation initiale de ces microorganismes sur graine (**Figure 5** ; Abdelfattah et al., 2021). Cette étude met également en évidence que l'abondance relative de certains taxons peu abondants dans les glands augmente significativement au niveau des plantules. Ces résultats confirment une fois de plus que l'abondance sur les graines ne constitue pas un indicateur fiable de l'abondance sur les plantules (Abdelfattah et al., 2021).

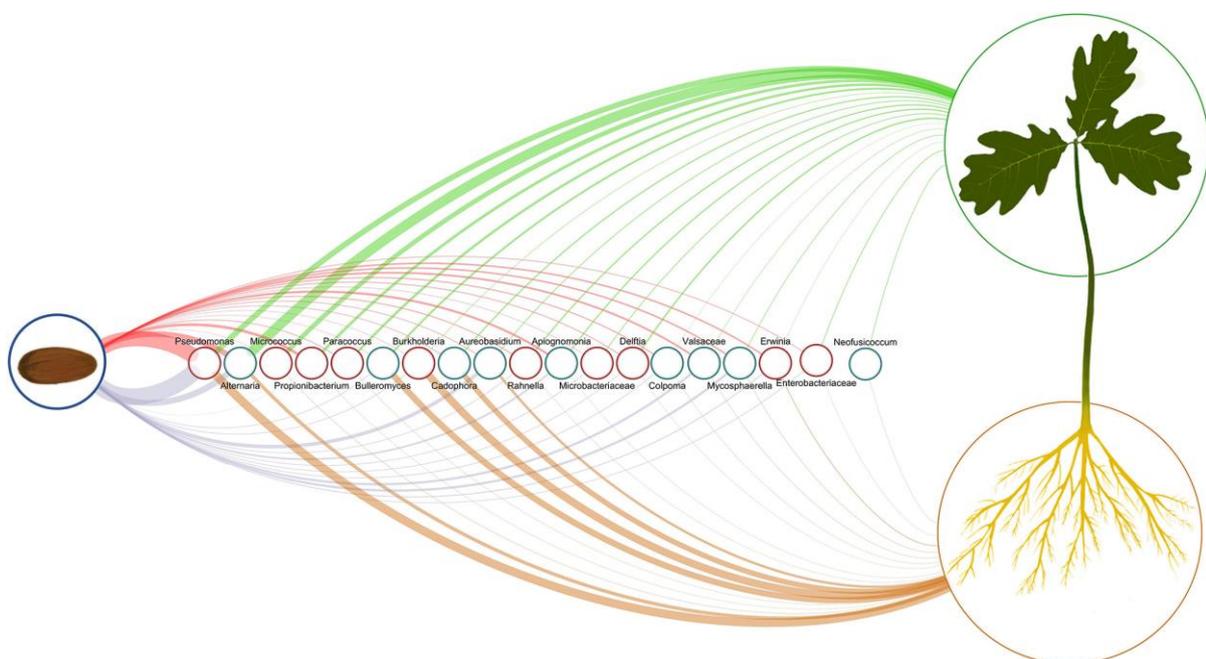


Figure 5. Distribution du microbiote des glands de chêne (*Quercus robur*) lors de la transmission aux plantules. Les couleurs des lignes correspondent aux types d'échantillons (rose : embryon, violet : péricarpe, brun : racines, vert : phyllosphère). La largeur de la ligne entre chaque genre et chaque type d'échantillon reflète l'abondance relative du genre dans ce type d'échantillon particulier. Les cercles bleus représentent les champignons, les cercles rouges les bactéries. D'après les travaux d'Abdelfattah et al. (2021).

c. Transmission du microbiote des graines en substrat non stérile

Les données issues des trois études précédemment présentées ont été obtenues en conditions gnotobiotiques en ignorant l'influence du sol lors de la germination et la levée des plantules. Pourtant, lors de la germination, la spermosphère (i.e. zone du sol sous l'influence des graines en germination) devient le théâtre d'une compétition microbienne intense. Cette compétition est alimentée par la libération de composés nutritifs par la graine en germination (Corso et al., 2021), attirant une diversité de microorganismes qui cherchent à coloniser cet habitat propice à leur croissance (Nelson, 2004). Les communautés microbiennes associées aux sols peuvent donc avoir un impact sur la transmission du microbiote des graines aux plantules.

La transmission aux plantules du microbiote de graines de 17 espèces végétales a été analysée après semis dans un substrat stérile (sable) ou non stérile (sol agricole) (Johnston-Monje et al., 2021). Dans ces conditions expérimentales, les taxons bactériens les plus fréquemment détectés au sein des lots de graines (> 60% des échantillons) représentaient en moyenne 60% et 85% de l'abondance relative des communautés bactériennes de la rhizosphère et de la phyllosphère. Concernant les champignons, l'influence du sol était plus marquée avec une abondance moyenne des taxons issus des graines de 30 et 40% dans les parties souterraines et aériennes (Johnston-Monje et al., 2021). Walsh et al. (2021) ont obtenu des résultats similaires en montrant que le microbiote bactérien des grains de blé contribuait en moyenne à hauteur de 45% au microbiote des plantules. Cependant, en inoculant les grains de blé avec des suspensions provenant de 219 sols différents, ils ont observé une variation considérable dans la contribution du microbiote des graines au microbiote des plantules, allant de 3% à 95% en fonction de la composition des communautés telluriques (Walsh et al., 2021). L'influence de la diversité microbienne du sol sur la composition du microbiote des plantules a également été mise en évidence au niveau du colza d'hiver (Rocheffort et al., 2021). Pour cette espèce végétale, en fonction du sol et indépendamment du génotype et de l'année de culture, les taxons microbiens telluriques représentaient 40 à 98% du microbiote des plantules. Le microbiote des graines quant à lui ne représentait que 1% des taxons bactériens et fongiques détectés au niveau des plantules (Rocheffort et al., 2021). Dans cette étude, les auteurs ont également détecté que 20 à 65% des taxons associés aux plantules provenaient d'origine inconnue. Ces taxons pourraient provenir d'autres sources environnementales. Il pourrait également s'agir de

taxons rares associés aux graines ou au sol et qui n'auraient pas été détectés à cause de leurs trop faibles abondances.

Ainsi, en considérant les compétitions microbiennes intenses qui se déroulent lors de la germination et la levée des plantules, il devient évident que les interactions microbiennes jouent un rôle crucial dans la structuration du microbiote des plantules. Ces interactions, influencées par le microbiote des graines et les microorganismes du sol, façonnent les communautés microbiennes qui accompagneront le développement des futures plantes.

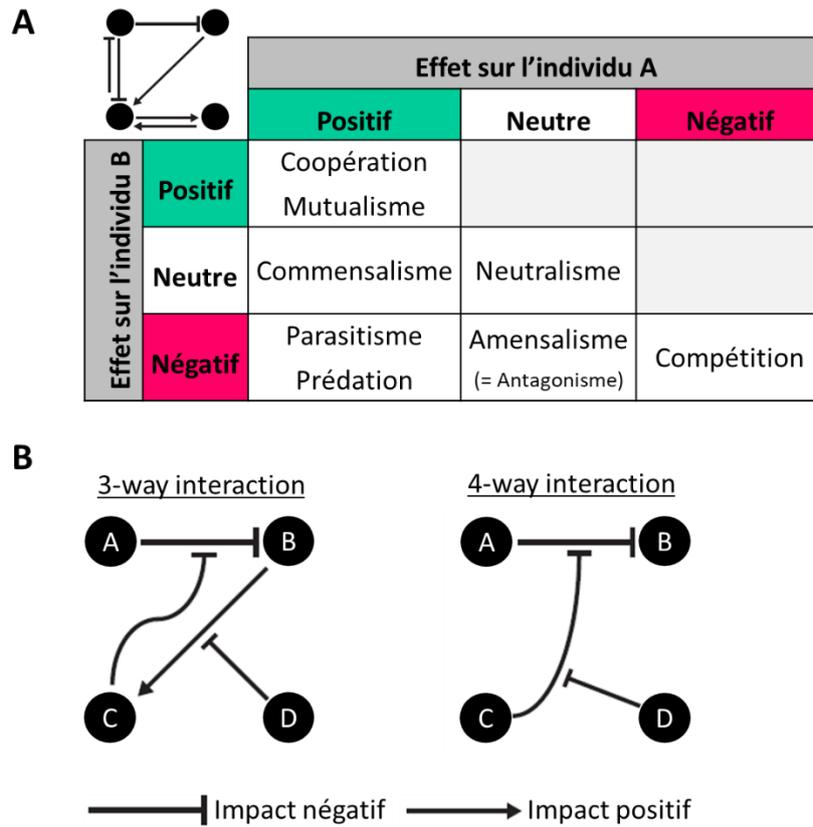


Figure 6. Les différents types d'interaction. (A) Types d'interaction entre deux individus et leur coaction. (B) Exemples d'interactions d'ordre supérieur (Bailey et al., 2016) avec i) interaction du 3^e ordre où un troisième individu module l'interaction entre deux autres (i.e. C dégrade un antibiotique produit par A, atténuant l'inhibition de B par A) et ii) interaction du 4^e ordre où un quatrième individu module la modulation d'une interaction entre deux individus par un troisième (i.e. D produit un composé qui inhibe l'enzyme de dégradation produite par C donc l'antibiotique produit par A peut inhiber B).

II. Interactions microbiennes

Au sein de leur environnement, les microorganismes vivent en communauté et interagissent les uns avec les autres (West et al., 2006). Il existe différents types d'interaction et la nature de celles mises en place entre deux individus peut avoir des impacts positifs, neutres ou négatifs sur leur croissance ou leur survie (**Figure 6A**). Les microorganismes sont fréquemment impliqués dans des interactions multi-espèces dites d'ordre supérieur où les interactions entre deux individus peuvent être modulées par d'autres, sans que ces derniers n'interagissent directement avec eux (**Figure 6B** ; Bairey et al., 2016; Grilli et al., 2017).

Les microorganismes vivent en communautés et doivent par conséquent gérer l'allocation de l'espace et des ressources nutritives disponibles au sein de leur environnement. Pour cela, les microorganismes peuvent adopter des comportements coopératifs ou compétitifs et la dynamique entre ces deux types d'interaction a des conséquences importantes sur la structuration des communautés microbiennes (D'Souza et al., 2018; Ghoul and Mitri, 2016; Gralka et al., 2020).

1. Coopération

La coopération désigne une forme d'interaction où des individus ou espèces travaillent ensemble dans le but d'obtenir des avantages mutuels (**Figure 6A**). La coopération peut prendre différentes formes, allant de comportements mutuellement bénéfiques, où tous les participants en tirent profit (+/+), à des actes altruistes, où un individu assume un coût direct dans le but d'aider un autre, même si le bénéfice n'est pas immédiatement réciproque (West et al., 2007).

a. La division du labeur

La division du labeur peut être illustrée par la façon dont différentes espèces microbiennes spécialisées coopèrent pour accomplir des tâches métaboliques que chacune d'elles ne pourrait pas réaliser efficacement de manière indépendante. Dans cette dynamique, chaque espèce ou souche effectue une partie spécifique d'un processus métabolique plus large, et le

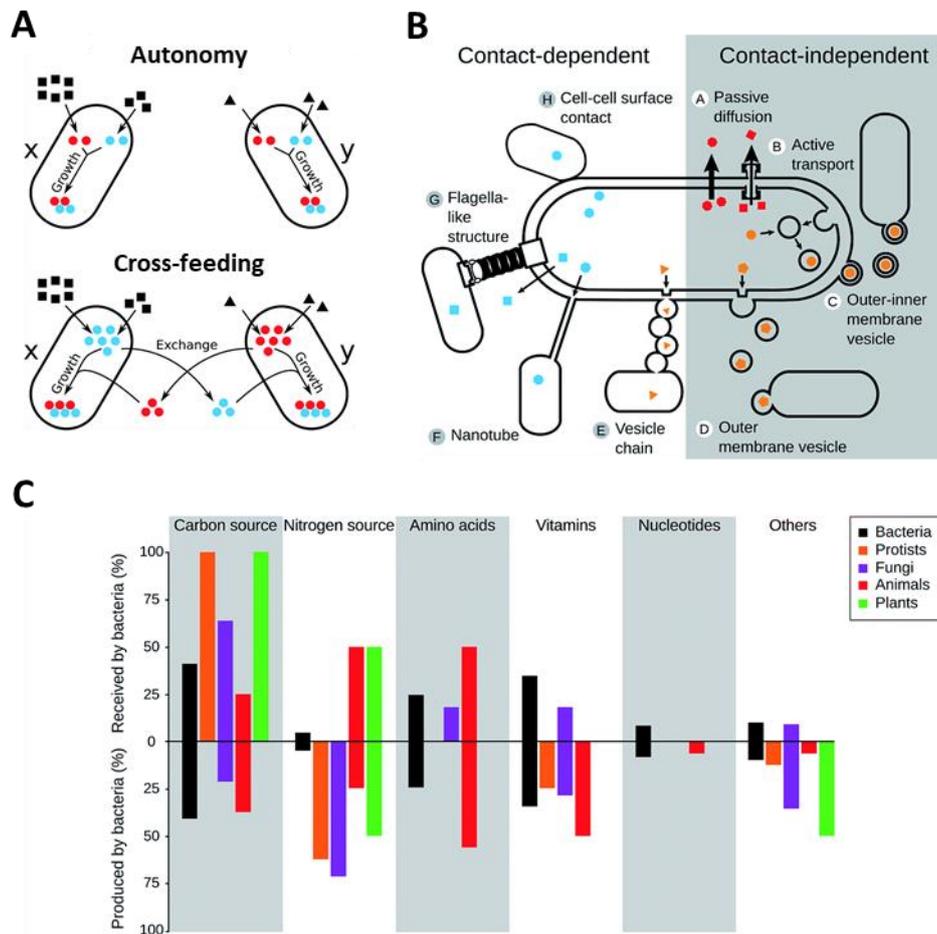


Figure 7. Cross-feeding : mécanismes et distribution. (A) Schéma illustrant les interactions de cross-feeding où l'échange de métabolites entre les deux partenaires résulte en une augmentation de leur croissance. (B) Mécanismes de transfert des métabolites dépendants du contact (à gauche) et indépendants du contact (à droite). (C) Résultat d'une méta-analyse illustrant le pourcentage de classes spécifiques de métabolites qui sont soit reçus (moitié supérieure) soit produits (moitié inférieure) par les bactéries dans les interactions de cross-feeding par rapport au nombre total de cas dans chaque catégorie (n = 135). (D'après D'Souza et al. 2018).

produit de l'activité métabolique d'un microorganisme sert de substrat pour un autre, créant ainsi un réseau d'interdépendance métabolique.

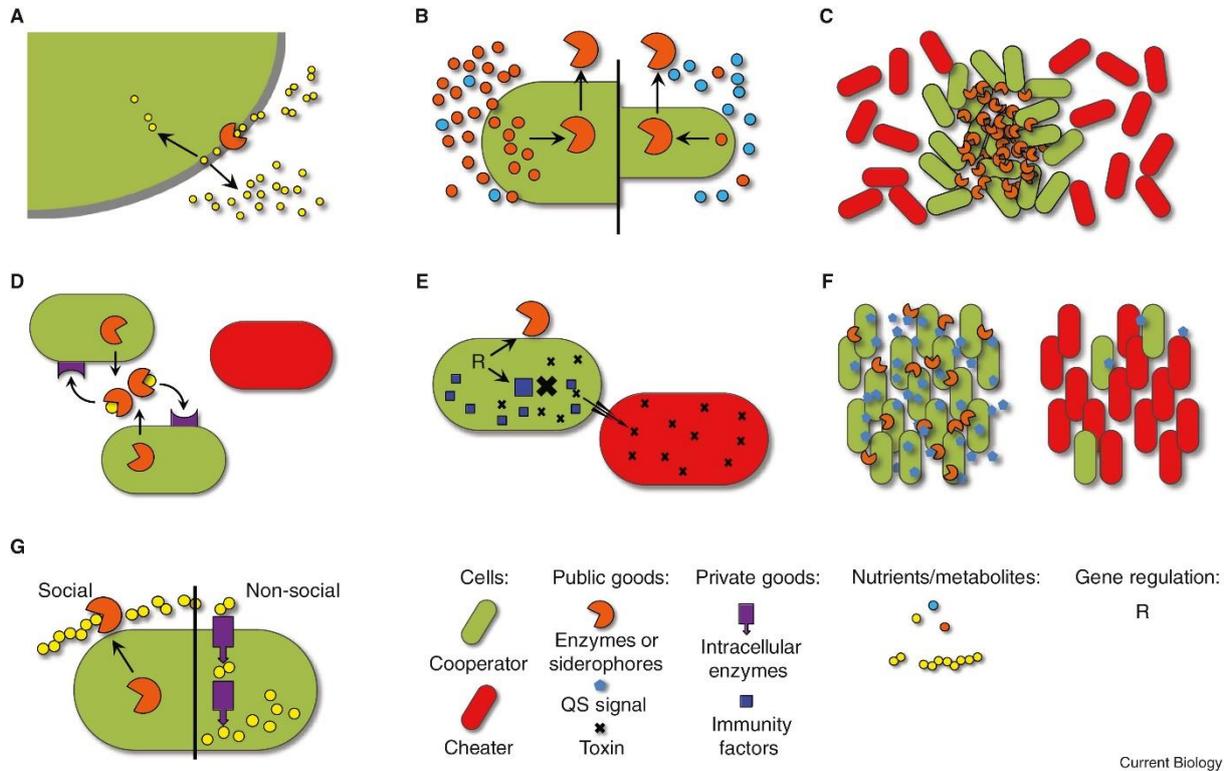
La syntrophie ou co-feeding

La syntrophie est décrite comme un « métabolisme mutuellement obligatoire » qui implique une coopération indispensable entre les microorganismes pour leur survie et leur croissance (Morris et al., 2013). Dans ce processus, les produits d'un microorganisme deviennent les substrats pour l'autre, permettant des réactions qui ne seraient pas réalisables séparément. Cette interaction est cruciale pour la dégradation de certains composés organiques, notamment dans des milieux anoxiques. Un exemple classique de syntrophie est la collaboration entre les bactéries fermentant l'éthanol en acétate et hydrogène et les archées méthanogènes qui utilisent l'hydrogène pour réduire le CO₂ en méthane (CH₄). Cette coopération réduit la pression partielle de l'hydrogène, rendant la fermentation de l'éthanol thermodynamiquement favorable (Stams and Plugge, 2009).

L'alimentation croisée ou cross-feeding

Le cross-feeding décrit les interactions qui impliquent l'échange de molécules (sources de carbone, source d'azote, acides aminés, nucléotides, fer, phosphore, et autres microéléments) entre les individus, résultant en une augmentation de leur croissance (**Figure 7A** ; Seth and Taga, 2014). On distingue deux types de cross-feeding. Le premier correspond à la dégradation d'un substrat par un individu A dont le sous-produit est utilisé par un individu B, ce qui se rapproche d'une interaction commensale (0/+). Le second type de cross-feeding, dit coopératif, permet, au deux individus de bénéficier mutuellement des sous-produits de l'autre (D'Souza et al., 2018; West et al., 2006). Dans le cas du cross-feeding coopératif, si deux individus (A et B) se nourrissent des sous-produits métaboliques de l'autre, la sélection naturelle peut favoriser une augmentation de la production de sous-produits par l'individu A. Cette augmentation bénéficierait à l'individu B, qui à son tour produirait davantage de sous-produits utilisables par l'individu A. En résulterait une augmentation de la population des deux individus (West et al., 2006).

Les interactions de cross-feeding impliquent des mécanismes contact-dépendants (nanotubes, chaînes de vésicules et autres structures) et des mécanismes contact-indépendants (vésicules membranaires, diffusion passive ou transports actifs) (**Figure 7B** ; D'Souza et al., 2018). Dans



Current Biology

Figure 8. Exemple de contrôles mis en place pour limiter l'impact des tricheurs (Smith and Schuster, 2019).

- (A) Privatisation partielle : une partie des nutriments digérés par une enzyme de dégradation associée à l'enveloppe cellulaire est capturée par la cellule avant de se diffuser.
- (B) Coût de fitness dépendant des nutriments : production des biens publics lorsque les nutriments nécessaires à la croissance sont en abondance, ce qui permet de minimiser le coût de la coopération.
- (C) Structuration spatiale : la croissance de groupes isolés de coopérateurs maintient les biens publics sécrétés à l'écart des tricheurs.
- (D) Discrimination du soi par l'utilisation de biens nécessitant une reconnaissance spécifique.
- (E) Discrimination du soi par la punition impliquant les systèmes toxines/antitoxines.
- (F) Discrimination du soi par le quorum-sensing : les biens publics ne sont produits que lorsque la population de coopérateurs est suffisante.
- (G) Adaptation non sociale : mutations génétiques qui améliorent la capacité à absorber efficacement les nutriments.

les deux cas, les échanges entre producteurs et consommateurs se produisent à des distances courtes qui peuvent varier entre 3 et 15 μm pour les mécanismes indépendants du contact (Dal Co et al., 2020; van Tatenhove-Pel et al., 2021).

Les interactions de cross-feeding sont courantes entre différentes espèces bactériennes et se produisent également entre les bactéries et d'autres règnes, comme les archées, les champignons, les animaux et les plantes, illustrant leurs rôles écologique et évolutif importants dans divers écosystèmes (**Figure 7C** ; D'Souza et al., 2018; Frey-Klett et al., 2011).

b. La production de biens publics

Les comportements coopératifs peuvent mener à la production de « bien publics » comme par exemple les enzymes de dégradation, les sidérophores, les toxines ou encore les biosurfactants (Smith and Schuster, 2019; West et al., 2006). Dans ces situations coopératives avec production de biens publics, des tricheurs qui exploitent les avantages des biens publics sans contribuer à leur production peuvent émerger et mettre en péril la stabilité des systèmes coopératifs (Smith and Schuster, 2019). La dynamique causée par l'abondance ou la suractivité des tricheurs peut conduire à la surexploitation des biens partagés, les transformant ainsi en ressources rares. Cette situation conduit à une impasse, où tant les coopérateurs que les tricheurs subissent des conséquences négatives, créant ainsi une situation perdant-perdant. Ce phénomène est conceptualisé sous le terme de « tragédie des biens communs » (Hardin, 1968). Pour maintenir la coopération et empêcher la prolifération des tricheurs, les microorganismes mettent en place divers mécanismes, tels que la privatisation partielle des biens publics, la structuration spatiale, la discrimination du soi ou le quorum-sensing (**Figure 8** ; Smith and Schuster, 2019). Ces mécanismes visent à limiter l'accès des tricheurs aux biens publics, à détecter et punir les tricheurs, ou à ajuster la production de biens publics en fonction de la proportion de coopérateurs dans la population. Ces mécanismes sont conçus pour réduire la compétition interne et maintenir la coopération au sein de la population microbienne.

2. Compétition

Dans leur environnement, les microorganismes rentrent en compétition pour l'accès à des ressources limitées tels que les nutriments (carbone, azote, phosphore, soufre, fer et autres micronutriments) et l'espace (Hibbing et al., 2010). Cette compétition peut prendre deux formes : la **compétition d'exploitation**, où les microorganismes rivalisent indirectement en consommant les ressources (compétition passive), et la **compétition par interférence**, où les cellules individuelles peuvent causer des dommages à leurs concurrents par l'utilisation d'armes microbiennes (Ghoul and Mitri, 2016; Gralka et al., 2020; Granato et al., 2019).

a. Compétition d'exploitation

La compétition d'exploitation se manifeste par la consommation de ressources nutritionnelles par une souche, restreignant ainsi l'accès à ces ressources pour ses compétiteurs. Cette compétition s'opère par exemple par la sécrétion de molécules telles que les sidérophores, qui permettent de capturer les nutriments métalliques (Kramer et al., 2020), ou par la production d'enzymes lytiques capables de dégrader des molécules complexes (Joshi et al., 2006). Un autre mécanisme de compétition d'exploitation implique l'utilisation des produits de sécrétion des compétiteurs voisins, comme évoquée précédemment avec les tricheurs (Seth and Taga, 2014). Les microorganismes rentrent également en compétition pour occuper des sites privilégiés dans une niche, tout en empêchant les autres d'y accéder (i.e. compétition pour l'espace) (Kim et al., 2014). Ceci peut passer par la capacité à coloniser rapidement un espace grâce à la mobilité ou à se développer rapidement grâce à un taux de croissance élevé (Gude et al., 2020).

La compétition d'exploitation joue par exemple un rôle prépondérant dans l'assemblage des communautés microbiennes associées aux racines des plantes où la composition des communautés est influencée à la fois par la nature des exsudats racinaires et par les préférences de substrat propres à chaque microorganisme (Zhalnina et al., 2018).

b. Compétition par interférence

Les microorganismes utilisent des mécanismes d'antagonisme pour restreindre le développement de leurs compétiteurs ou libérer l'espace, facilitant ainsi leur accès à des niches spécifiques. Les interactions antagonistes sont très répandues aux sein des microorganismes

(Cordero et al., 2012; Granato et al., 2019; Peterson et al., 2020). En évaluant les interactions d'antagonisme entre 67 espèces bactériennes issues de 8 environnements distincts, totalisant ainsi 2 211 paires d'espèces et 4 422 interactions, Russel et al. ont mis en évidence que la probabilité de ce type d'interaction était plus élevée entre des espèces étroitement apparentées, présentant une proximité phylogénétique et métabolique importante (Figure 9 ; Russel et al., 2017).

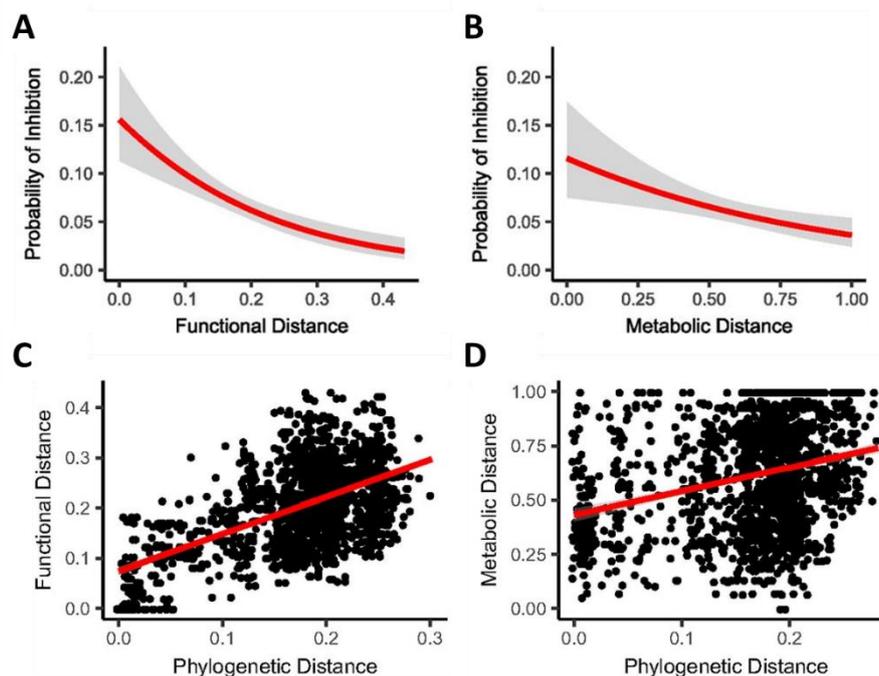


Figure 9. Corrélation entre la probabilité d'antagonisme et la distance fonctionnelle et métabolique (Russel et al., 2017). (A) La probabilité d'inhibition augmente avec la proximité fonctionnelle. La ligne rouge représente une régression logistique et la zone grise indique les intervalles de confiance à 95% ($P < 0,001$, $n = 2\,211$). (B) La probabilité d'inhibition augmente avec la proximité métabolique, calculée à partir des profils de croissance sur les BiOLOG Ecoplates. La ligne rouge représente une régression logistique et la zone grise indique les intervalles de confiance à 95% ($P = 0,0023$, $n = 1\,770$). Corrélation entre la distance phylogénétique et (C) la distance fonctionnelle ou (D) la distance métabolique. La probabilité d'inhibition augmente donc avec la proximité phylogénétique.

Cette étude a aussi démontré que la capacité d'antagonisme est souvent associée à un mode de vie généraliste, c'est-à-dire à des bactéries capables d'exploiter un large éventail de ressources. Cela suggère que la polyvalence métabolique pourrait être un facteur clé dans la compétition microbienne par interférence (Russel et al., 2017).

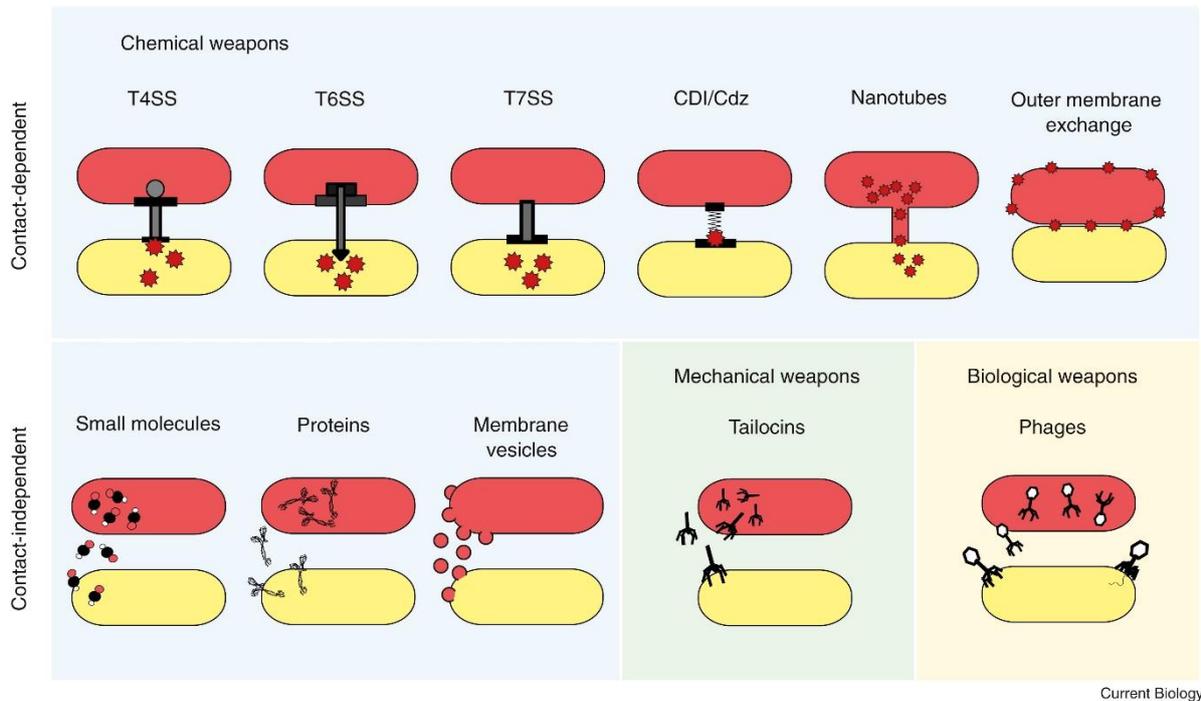


Figure 10. Exemples de différents types d'armes microbienne (Granato et al., 2019). Les mécanismes d'antagonisme bactériens incluent les mécanismes dépendants du contact (panel du haut) et les mécanismes indépendants du contact (panel du bas). Les mécanismes dépendants du contact comprennent, par exemple, les systèmes de sécrétion de type IV (T4SS), VI (T6SS) ou VII (T7SS), les systèmes d'inhibition de la croissance dépendante du contact (CDI) (et les CDI par la protéine à fermeture éclair de glycine - Cdz), les nanotubes, ainsi que les mécanismes d'échange de la membrane externe. Les mécanismes indépendants du contact comprennent les petites molécules (i.g. les bactériocines), les protéines (i.g. les enzymes lytiques), les vésicules membranaires, les tailocines et les phages.

Les nombreux mécanismes d'antagonisme comprennent des mécanismes dépendants du contact qui permettent aux microorganismes de tuer leurs compétiteurs en proximité étroite, ainsi que des mécanismes indépendants du contact, ayant une portée plus étendue (**Figure 10**; Granato et al., 2019; Peterson et al., 2020).

Mécanismes indépendants du contact

Ces mécanismes d'antagonisme sont produits par les microorganismes et sont sécrétés dans le milieu extérieur. Parmi ces mécanismes, on distingue les **petites molécules** (< 10kDa) telles que les bactériocines (Gordon et al., 2007) ; les **protéines toxiques** (>10 KDa) souvent libérées dans le milieu extérieur par lyse des cellules productrices, comme les colicines (Cascales et al., 2007) ; les **vésicules membranaires** produites par diverses bactéries et délivrant de nombreux composants cellulaires incluant des toxines ou des **enzymes lytiques** pouvant dégrader la paroi cellulaire des cellules cibles (Toyofuku et al., 2023) ; ou encore les **tailocines** (Patz et al., 2019).

Mécanismes dépendants du contact

Les mécanismes dépendants du contact exigent une proximité et une interaction directe entre les cellules. Ces mécanismes impliquent par exemple les **systèmes d'inhibition de la croissance dépendants du contact (CDI)** qui sont des protéines filamenteuses contenant un domaine toxique et une partie responsable de l'exportation et de l'ancrage à la surface de l'agresseur. Au contact du filament avec une cellule cible, le domaine toxique est alors transloqué dans la proie (Hayes et al., 2014; Ruhe et al., 2013). On retrouve également les **mécanismes d'échange de la membrane externe (OME)** qui permettent de délivrer des protéines toxiques intégrées dans la membrane externe lors d'un contact cellule-cellule (Vassallo et al., 2017) ou encore les **nanotubes** qui sont des structures reliant le cytoplasme de bactéries voisines et qui permettent le transfert direct de toxines et d'autres molécules entre les cellules.

Les mécanismes dépendants du contact incluent également les systèmes de sécrétions comme le **système de sécrétion de type III (T3SS)** généralement impliqué dans les interactions avec les hôtes eucaryotes supérieurs ou microbiens comme les oomycètes (Rezzonico et al., 2005), le **système de sécrétion de type IV (T4SS)** utilisé par les bactéries Gram-négatives pour injecter des toxines directement dans leurs compétiteurs (Costa et al., 2024; Souza et al., 2015), le **système de sécrétion de type VI (T6SS)** que nous allons détailler dans la prochaine partie et le

système de sécrétion de type VII (T7SS) utilisé par les bactéries Gram-positives pour injecter des toxines dans les cellules cibles (Cao et al., 2016).

L'efficacité des mécanismes dépendants ou indépendants du contact dépend des densités cellulaires des populations bactériennes et du ratio entre les cellules productrices et les cellules cibles (Celik Ozgen et al., 2018). Pour les mécanismes indépendants du contact, comme la libération de bactériocines ou de toxines, une densité cellulaire élevée augmente la probabilité que les molécules antagonistes atteignent et affectent les cellules cibles. Si la population de bactéries productrices est dense, il y aura une concentration plus élevée de ces composés dans l'environnement, augmentant ainsi leur efficacité. Dans le cas des mécanismes dépendants du contact, une densité cellulaire élevée facilite les interactions physiques entre les cellules. Un ratio élevé de cellules productrices par rapport aux cellules cibles signifie également une plus grande probabilité que chaque cellule cible rencontre une cellule productrice, permettant ainsi une interaction directe plus fréquente et plus efficace.

3. Interactions microbiennes et structuration des communautés

La coopération par cross-feeding et la compétition pour les ressources sont deux moteurs essentiels de l'assemblage des communautés microbiennes. Les communautés microbiennes dites compétitives sont composées de nombreux généralistes. L'abondance des généralistes dans ces communautés se traduit par un fort recouvrement métabolique entre les espèces, entraînant une forte compétition pour les mêmes ressources. A l'inverse, les communautés de type coopératives sont majoritairement composées de spécialistes (i.e. individus capables de dégrader certains substrats et présentant de nombreuses auxotrophies). Les communautés coopératives se caractérisent par un réseau de cross-feeding important qui stabilise la composition de ces communautés. Cependant, en créant des interdépendances, la coopération peut également entraîner un risque d'affaiblissement mutuel et déstabiliser les communautés en cas de perturbation biotique (Coyte et al., 2015). Dans ce cas, la présence de compétiteurs au sein de la communauté est importante pour la stabilisation de sa composition (Coyte et al., 2015).

La prédiction des réseaux métaboliques de communautés composées de compétiteurs ou de coopérateurs a été réalisée par une approche de modélisation métabolique à l'échelle du génome (Machado et al., 2021). Les simulations de communautés microbiennes le long d'un gradient coopératif-compétiteur ont mis en évidence une résistance plus importante à l'invasion au sein des communautés de type compétitif. Ces communautés sont en revanche plus sensibles aux perturbations abiotiques qui entraînent la création de nouvelles niches (Machado et al., 2021). Les communautés coopératives sont principalement composées de bactéries éloignées phylogénétiquement et possédant des capacités métaboliques limitées (Machado et al., 2021). Cependant, les interactions coopératives peuvent également s'établir entre espèces généralistes très apparentées (Goldford et al., 2018). La clé de la coexistence réside moins dans la simple dissimilarité métabolique réduisant la compétition, mais plutôt dans une dissimilarité qui conduit à des capacités métaboliques complémentaires (Zelezniak et al., 2015).

Si la coopération et la compétition pour les ressources sont fréquemment étudiées pour comprendre les dynamiques d'assemblage des communautés microbiennes, l'impact de la compétition par interférence est encore peu documenté. Pourtant, les mécanismes d'interférence semblent jouer un rôle clé dans les interactions trophiques entre les microorganismes.

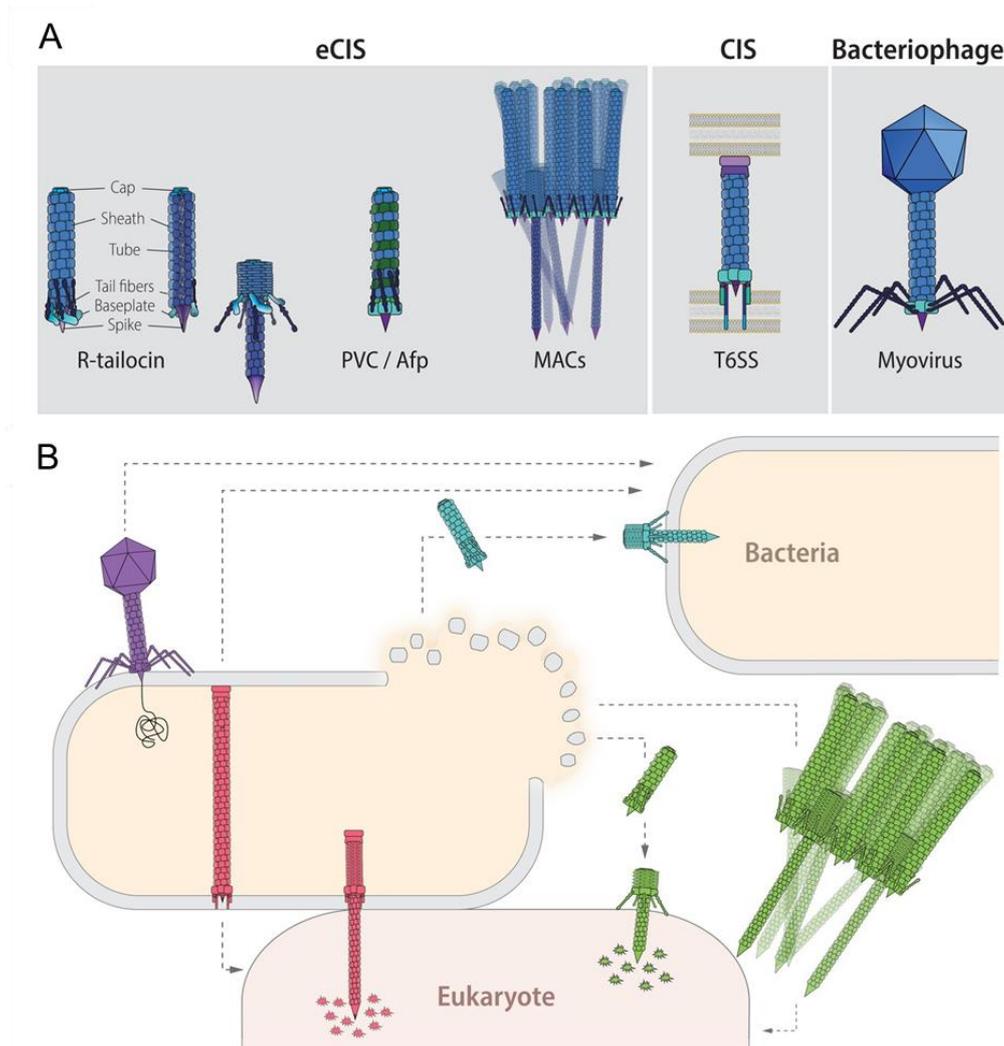


Figure 11. Représentation schématique et distribution phylogénétique des systèmes d'injection contractiles (CIS). (A) Les CIS sont supposés avoir évolué à partir de la queue contractile des bactériophages *Myoviridae* et peuvent être classés en deux groupes principaux : les CIS extracellulaires (eCIS) et les systèmes de sécrétion de type VI ancrés dans la paroi cellulaire (T6SS). Les CIS extracellulaires comprennent les R-tailocines (à gauche, état étendu ; à droite, état contracté ; les couleurs indiquent les différents éléments constitutifs) ainsi que diverses structures de type queue de phage telles que les cassettes de virulence de *Photorhabdus* (PVC), les prophages anti-alimentaires (Afp) et les structures contractiles inductrices de métamorphose (MAC). (B) Les bactériophages (violet) interagissent directement avec une cellule bactérienne hôte en injectant leur contenu génétique. Les T6SS (rouge) sont assemblés dans la cellule productrice et, lors du contact avec une cellule cible (procaryote ou eucaryote), le dispositif se contracte et injecte des effecteurs toxiques directement dans la cellule cible. Les CIS extracellulaires sont libérés lors de la lyse de la cellule productrice. Les R-tailocines (bleu clair) ciblent uniquement d'autres bactéries en perforant et en déstabilisant leur membrane sans injecter d'effecteurs, tandis que les PVC, Afps et MAC (vert) ciblent les cellules eucaryotes en injectant des effecteurs protéiques toxiques. D'après Heiman et al., (2023).

III. Le système de sécrétion de type VI

1. Définition des T6SS

a. Des systèmes d'injection contractiles pas comme les autres

Les T6SS font partie de la famille des systèmes d'injection contractiles (CIS) (Heiman et al., 2023; Patz et al., 2019). Les CIS sont des structures protéiques similaires à des queues de phages avec qui ils partagent des origines évolutives communes (Heymann et al., 2013; Kube et al., 2015; Leiman et al., 2009; Sarris et al., 2014). Les CIS sont tous composés d'une plateforme d'assemblage, d'un tube interne coiffé d'une pointe et d'une gaine contractile entourant le tube interne (Taylor et al., 2018 ; **Figure 11A**). Lorsque les CIS entrent en contact avec une cellule cible, la gaine contractile se contracte et propulse le tube interne qui va alors perforer les cellules cibles pour y injecter ou non des effecteurs protéiques. Deux types de CIS se distinguent : les CIS extracellulaires (eCIS) et les CIS internes (T6SS).

Les CIS extracellulaires comprennent les tailocines de type R (Patz et al., 2019), les cassettes de virulence de *Photorhabdus* (PVC) (Yang et al., 2006), les prophages anti-alimentaires (Afp) de *Serratia entomophila* (Heymann et al., 2013; Hurst et al., 2004) et les structures contractiles inductrices de métamorphose (MAC) de *Pseudoalteromonas luteoviolacea* (Shikuma et al., 2014) (**Figure 11A**). Les eCIS sont relargués dans le milieu extérieur à la suite de la lyse des cellules productrices et s'attachent à la surface des cellules cibles où se déroule leurs activités. Les tailocines de type R (R-pyocines) ciblent exclusivement les bactéries et ne sécrètent pas d'effecteurs protéiques toxiques. En perforant la paroi des cellules bactériennes cibles, elles détruisent le potentiel membranaire des cellules et entraînent l'effondrement de la force proton motrice (Patz et al., 2019). Les Afp, PVC et MAC ciblent quant à eux les cellules eucaryotes pour y injecter des effecteurs protéiques toxiques (**Figure 11B**). Les Afp et PVC des bactéries entomopathogènes *Serratia* et *Photorhabdus* participent ainsi à la virulence des bactéries en injectant des toxines insecticides (Heymann et al., 2013; Hurst et al., 2004; Yang et al., 2006). Les MAC participent à la virulence de *Pseudoalteromonas luteoviolacea* en induisant la métamorphose des larves de vers tubicoles marins (Shikuma et al., 2014).

Contrairement aux eCIS, les T6SS sont des CIS internes ancrés dans la paroi cellulaire des cellules productrices et sont exclusivement produits par des bactéries Gram-négatives.

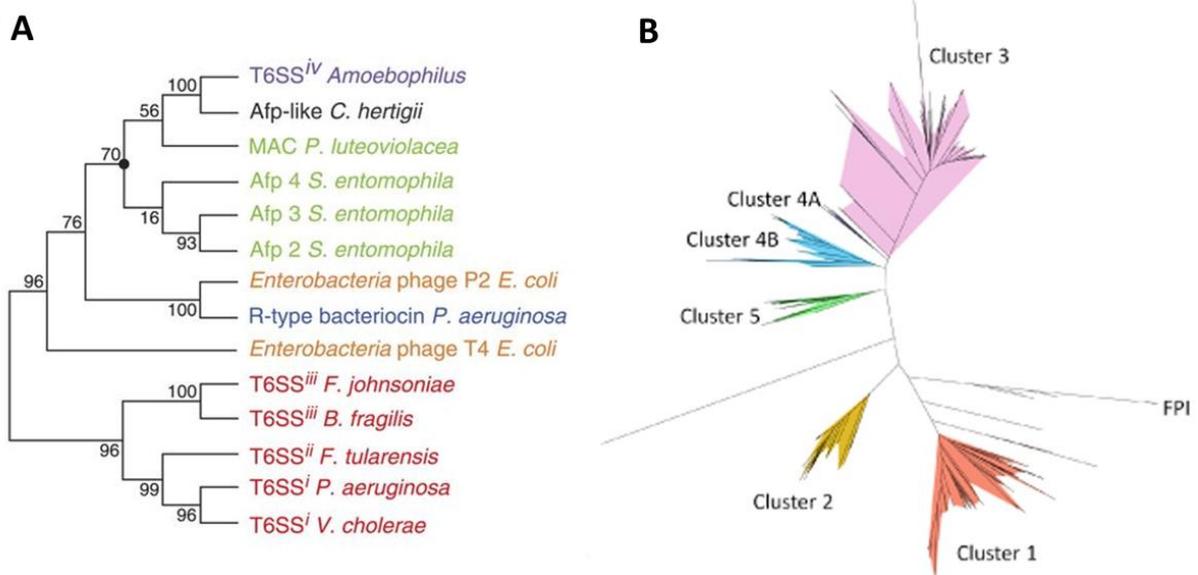


Figure 12. Distributions phylogénétiques des CIS et T6SS. (A) Distribution phylogénétique des CSI basée sur les séquences protéiques d'un composant de la gaine contractile conservé. Les T6SSⁱ⁻ⁱⁱⁱ forment un groupe monophylétique alors que le T6SS^{iv} est regroupé des eCIS comme les MAC. (B) Distribution phylogénétique des T6SSⁱ. L'arbre de distance (maximum de vraisemblance) a été calculé à partir de 1127 homologues de TssB. Les T6SSⁱ sont divisés en six groupes distincts : i1, i2, i3, i4a et i4b et i5. D'après les travaux de Barret et al., 2013 et Böck et al., 2017.

Contrairement aux eCIS qui affectent des cellules distantes de plusieurs micromètres, le fonctionnement des T6SS nécessite un contact étroit entre les bactéries productrices et les cellules cibles (**Figure 11B**). Comme nous le verrons dans cette partie d'introduction, les T6SS peuvent sécréter une grande variété d'effecteurs protéiques et peuvent cibler les cellules procaryotes et/ou les cellules eucaryotes.

b. Les différents types de T6SS

Quatre sous-types de T6SS ont été décrits dans la littérature (T6SS^{i-iv}). Le T6SSⁱ est majoritairement retrouvé chez les Pseudomonadata, le T6SSⁱⁱ est spécifique au genre *Francisella* (de Bruin et al., 2007; Clemens et al., 2015), le T6SSⁱⁱⁱ est uniquement présent chez les Bacteroidetes (Russell et al., 2014) et le T6SS^{iv} a récemment été décrit chez l'espèce *Amoebophilus asiaticus* (Böck et al., 2017). Ces quatre sous-types varient dans leur nombre de composants structuraux qui s'assemblent différemment et partagent très peu d'homologie (**Tableau 1**). La classification phylogénétique des CIS, établie à partir des séquences protéiques de leurs composants structuraux communs, indique que les T6SSⁱ⁻ⁱⁱⁱ forment un groupe monophylétique, tandis que le T6SS^{iv} présente des homologies avec les MAC (**Figure 12A**; Böck et al., 2017).

Le T6SS canonique correspond au sous-type i. Le T6SSⁱ a été découvert chez les espèce *Pseudomonas aeruginosa* et *Vibrio cholerae* (Mougous et al., 2006; Pukatzki et al., 2006). Le T6SSⁱ peut être subdivisé en plusieurs groupes (**Figure 12B**) : i1, i2, i3, i4a, i4b et i5 (Barret et al., 2011; Barret et al., 2013; Bernal et al., 2018; Boyer et al., 2009). Ces groupes partagent les mêmes protéines structurales (Tss) qui sont indispensables à leur assemblage et leur fonctionnement. En revanche, ils diffèrent au niveau de leurs protéines accessoires (Tag) qui sont spécifiques à chaque groupe.

Tableau 1. Résumé des composants structuraux essentiels des T6SS. Les T6SS de type i représentent les T6SS canoniques des *Pseudomonas*, les T6SS de type ii se trouvent chez *Francisella*, les T6SS de type iii se trouvent chez les *Bacteroidetes*, tandis qu'un seul T6SS de type iv a été décrit expérimentalement chez *Amoebophilus*. Certains composants du T6SS ont des homologies avec les protéines du bactériophage T4. Ce tableau est une synthèse des travaux de Gallegos-Monterrosa et Coulthurst (2021) ; Clemens, Lee et Horwitz (2018) ; Liu et al. (2022) et Bongiovanni et al. (2024).

Composant	Rôle	Type i T6SS	Type ii T6SS	Type iii T6SS	Type iv T6SS	T4 phage
TssA	Promeut la polymérisation de la gaine et coordonne l'assemblage du tube et de la gaine	✓				
TssB	Gaine contractile (petite sous-unité)	✓	IglA	✓	✓	gp18
TssC	Gaine contractile (grande sous-unité)	✓	IglB	✓		
Hcp (TssD)	Structure de perforation (tube interne)	✓	IglC	✓	✓	gp19
TssE	Plateforme d'assemblage	✓	IglJ	✓	✓	gp25
TssF	Plateforme d'assemblage	✓	IglH	✓	✓	gp6
TssG	Plateforme d'assemblage	✓		✓		gp7
TssH (ClpV)	ATPase de désassemblage de la gaine	✓	ClpB	✓		
PAAR	Structure de perforation (cône)	✓	IglG	✓	✓	gp5.4
VgrG (TssI)	Structure de perforation (pointe)	✓	VgrG + PdpA	✓	gp27 + gp5	gp27 + gp5
TssJ	Complexe membranaire (lipoprotéine de la membrane externe)	✓	IglE			
TssK	Plateforme d'assemblage	✓	IglD	✓		
TssL	Complexe membranaire (protéine de la membrane interne)	✓	DotU			
TssM	Complexe membranaire (protéine de la membrane interne)	✓	PdpB			
TssN	Complexe membranaire (protéine de la membrane interne)			✓		
TssO	Complexe membranaire (protéine de la membrane interne)			✓		
TssP	Complexe membranaire (protéine de la membrane interne)			✓		
TssQ	Complexe membranaire (protéine de la membrane interne)			✓		
TssR	Complexe membranaire (lipoprotéine de la membrane externe potentielle)			✓		
T6SS ^{iv} (plateforme d'assemblage)	Composants de la plateforme d'assemblage additionnels				✓	gp48, gp6, gp53, gp54
T6SS ^{iv} (termineur)	Contrôle de la longueur du tube et de la gaine ?				✓	gp15
T6SS ^{iv} (protéine de mesure)	Contrôle de la longueur du tube et de la gaine ?				✓	gp29
T6SS ^{iv} (Afp-like)	Contrôle de la longueur du tube et de la gaine ?				✓	

2. Structure des T6SS

a. Structure du T6SS canonique (T6SSⁱ)

Protéines structurales conservées

Le T6SS est composé de 14 protéines structurales conservées qui s'assemblent en quatre structures distinctes (**figure 13**) :

- Le complexe membranaire TssJLM permet l'ancrage du T6SS au niveau des membranes interne et externe. Il sert de station d'accueil à la plateforme d'assemblage et forme un canal permettant le passage de l'aiguille après contraction de la gaine. Il est composé des protéines de la membrane interne TssL et TssM, ainsi que de la lipoprotéine de la membrane externe TssJ (Rapisarda et al., 2019; Yin et al., 2019). Les protéines du complexe membranaire n'ont pas d'homologues chez les bactériophages et les eCIS (Taylor et al., 2018). En revanche, TssL et TssM sont homologues à deux sous-unités du système de sécrétion de type 4 (T4SSb), DotU et IcmF (Filloux et al., 2008).
- La plateforme d'assemblage TssKFGE est connectée au complexe membranaire grâce à l'interaction entre TssK et les domaines cytoplasmiques des protéines TssL et TssM (Nazarov et al., 2018). Elle sert de plateforme à l'assemblage de la gaine contractile et est essentielle pour l'assemblage correct du tube interne Hcp (Haemolysine Coregulated Protein) (Brunet et al., 2015; Cherrak et al., 2018).
- L'aiguille est composée du tube interne Hcp surmonté par le complexe de la pointe composé d'un trimère de protéines VgrG (Valine glycine repeat protein G) surplombé par un cône PAAR (Pro-Ala-Ala-arginine) (Shneider et al., 2013). Le tube interne est composé d'hexamères de la protéine Hcp qui forment des anneaux qui s'empilent les uns sur les autres. La polymérisation du tube Hcp débute par le recrutement du premier anneau à la base d'un trimère de protéines VgrG préalablement positionné au niveau de la plateforme d'assemblage. C'est au niveau des composants de l'aiguille que se fixent les effecteurs du T6SS.

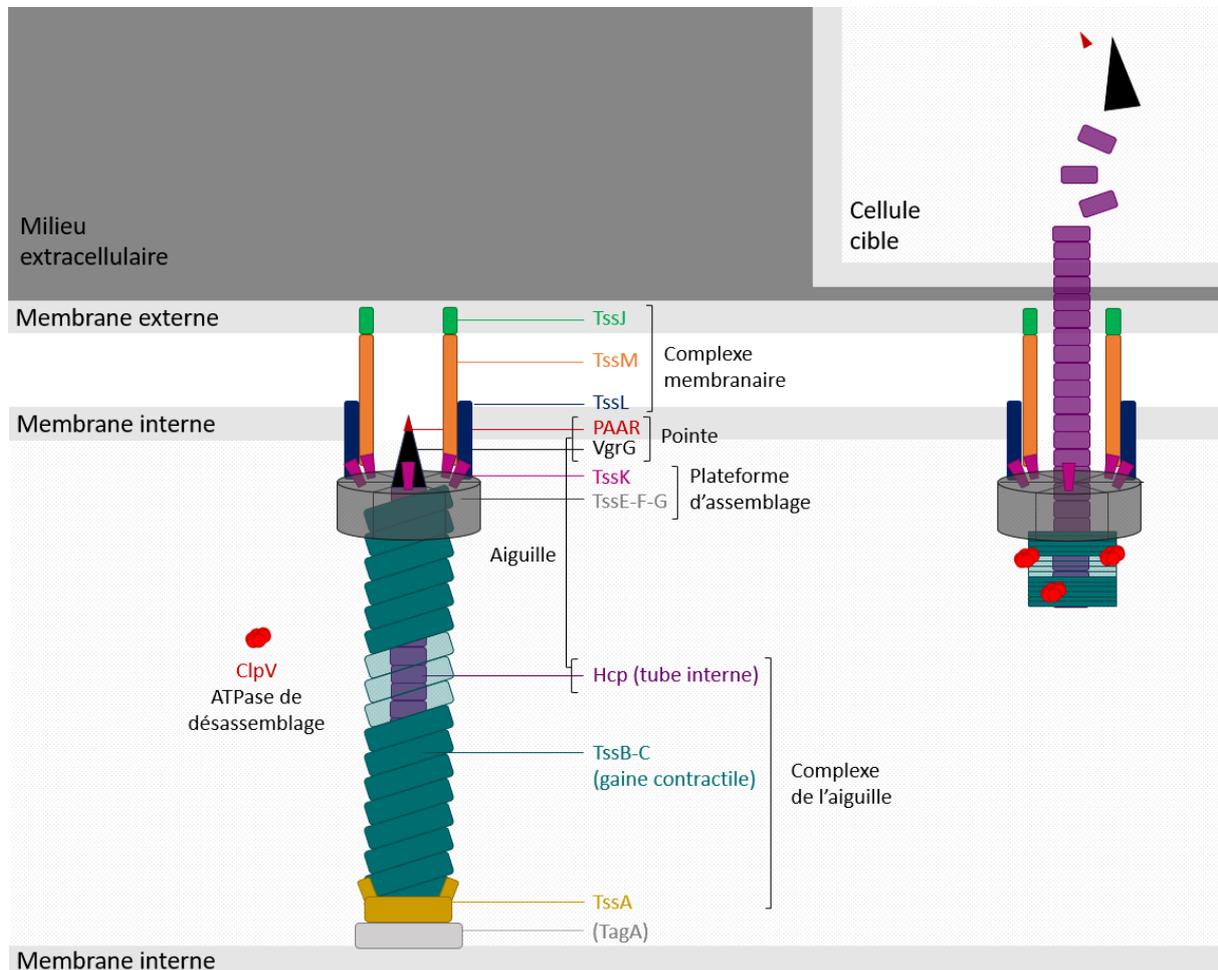


Figure 13. Représentation de la structure du T6SS canonique. Le T6SS est composé de 14 protéines structurales qui s'assemblent en quatre structures distinctes. Le **complexe membranaire** (TssJLM) ancre le système aux membranes interne et externe. Il est lié à la **plateforme d'assemblage** (TssKFGE) grâce à la protéine TssK. La plateforme permet l'assemblage de l'**aiguille** composée de la pointe VgrG-PAAR et du tube interne Hcp. Le tube interne fait partie du complexe de l'aiguille englobant également la **gaine contractile**. La polymérisation du tube interne et de la gaine contractile se fait en même temps et est coordonné par la protéine TssA. La polymérisation s'arrête lorsque la membrane interne opposée est atteinte. Lorsque la cellule productrice rentre en contact avec une cellule cible, la gaine contractile propulse l'aiguille qui va perforer la cellule cible et injecter ses composants et les effecteurs associés. La contraction de la gaine rend accessible un motif de reconnaissance pour ClpV, dont le rôle est de désassembler les composants de la gaine qui pourront ensuite être réutilisés pour former un nouveau T6SS. Le schéma est inspiré des travaux de Cherrak et al., (2018).

- La gaine contractile TssBC est composée des protéines TssB et TssC qui s'assemblent en dimères TssBC. Six dimères TssBC forment un anneau de la gaine qui enveloppe alors un anneau hexamérique Hcp. La polymérisation de la gaine contractile débute au niveau de la plateforme d'assemblage, en même temps que la polymérisation du tube Hcp. L'insertion d'un anneau de la gaine suit immédiatement celle d'un anneau hexamérique Hcp (Basler et al., 2012; Brunet et al., 2014; Kudryashev et al., 2015).

L'assemblage du tube interne Hcp et de la gaine contractile est coordonné par la protéine TssA localisée à l'extrémité distale où les anneaux Hcp et TssBC sont incorporés (Vettiger et al., 2017; Zoued et al., 2016). La polymérisation du tube et de la gaine se déroule au niveau du cytoplasme et s'arrête lorsque l'extrémité distale atteint la membrane interne opposée (Santin et al., 2019b). L'aiguille et la gaine contractile forment un complexe d'environ 1 μ m de long qui s'assemble en 30-50 secondes (Basler et al., 2012; Brunet et al., 2013). Une fois l'aiguille et la gaine polymérisées, le T6SS se trouve en position armée.

L'évènement de tir se déroule lorsque la gaine contractile se contracte et propulse l'aiguille au niveau des cellules cibles. Cette propulsion ne demande pas d'énergie. La contraction de la gaine se fait par force mécanique. En effet, les protéines TssBC subissent une réorganisation qui entraîne alors une rotation des sous-unités de la gaine qui se contractent en direction de la plateforme d'assemblage. Cette rotation abolit le contact entre la gaine et le tube interne Hcp, permettant alors la propulsion de l'aiguille à travers le complexe membranaire. La contraction se fait en quelques millisecondes et génère une force considérable (44,000 kcal mol⁻¹), ce qui permet à l'aiguille de perforer la cellule cible afin d'y délivrer ses composants et les effecteurs associés (Brackmann et al., 2018; Wang et al., 2017). Après la contraction, les composants de la gaine sont désassemblés par l'AAA+ ATPase ClpV (TssH) qui reconnaît un motif sur TssB exposé seulement lorsque la gaine est contractée (Kube et al., 2014; Wang et al., 2017). Les protéines TssB et TssC désassemblées sont alors recyclées pour former de nouveaux T6SS (Kapitein et al., 2013).

Chez *Vibrio cholerae* 2740-80 (T6SS i1) les cellules productrices peuvent également réutiliser les protéines Hcp qui leur sont injectées par leurs cellules clonales (Vettiger and Basler, 2016). La réutilisation des protéines de structure permet un assemblage plus efficace et un coût de production potentiellement moins important.

Le coût de production du T6SS

A leur pic de production, chaque cellule bactérienne produit entre 10^2 et 10^4 copies de chaque protéine structurales (Lin et al., 2019). La production de T6SS est considérée comme coûteuse en énergie (Basler, 2015; Unni et al., 2022). Cette hypothèse est notamment utilisée dans les modèles mathématiques utilisés pour simuler les compétitions inter-bactériennes médiées par le T6SS (Lin et al., 2023; Smith et al., 2020b; Smith et al., 2020a). Toutefois, plusieurs travaux récents semblent réfuter cette hypothèse puisque l'expression et la production de T6SS n'engendre pas ou un très faible coût métabolique chez *Vibrio fischeri* (Septer et al., 2023), *V. cholerae* (Zhang et al., 2023), *E. coli* (Taillefer et al., 2023) ou *Bacteroidetes fragilis* (Robitaille et al., 2023). Chez cette dernière espèce, l'abondance des cellules possédant un T6SS diminue drastiquement au sein du microbiote intestinal adulte par rapport au microbiote intestinal infantile (Robitaille et al., 2023). Au lieu d'être la conséquence d'un coût énergétique, cette contre-sélection des T6SS pourrait être liée aux coûts de fitness qu'ils peuvent engendrer. En effet, leur production et leur utilisation peuvent parfois s'avérer désavantageuses dans certains environnements. Par exemple, dans certaines conditions de stress, comme la présence de sels biliaires, les T6SS agissent comme des canaux transmembranaires permettant l'entrée de molécules toxiques dans les cellules bactériennes, ce qui conduit à une diminution de la population des souches productrices (Gupta et al., 2021).

Protéines accessoires

Les protéines accessoires (TagA-Z) sont spécifiques à chaque groupe de T6SSⁱ et sont conservées au sein de chacun de ces groupes. Toutes n'ont pas de fonction décrite mais pour certaines, leur rôle dans l'assemblage, la régulation ou l'interaction avec les cellules cibles a été démontré.

Assemblage

Dans la plupart des T6SS, la protéine TssL (complexe membranaire) contient un domaine de liaison au peptidoglycane (i.e. TssL spécialisée). Dans d'autre T6SS, le domaine de liaison au peptidoglycane est porté par des protéines accessoires comme **TagL**, **TagP**, **TagN** ou encore **TagW** (Aschtgen et al., 2010; Aschtgen et al., 2010; Nguyen et al., 2021; Santin et al., 2019a). La protéine TagL présente au niveau du T6SS i4b de *E. coli* S17-2 est la seule à avoir été validée expérimentalement pour son rôle de liaison au peptidoglycane. En son absence, le T6SS n'est pas assemblé (Santin et al., 2019a).

Toujours en lien avec le complexe membranaire, une lipoprotéine de la membrane externe, **TagV**, a récemment été décrite chez *Serratia marcescens* db11 (T6SS i3) comme jouant un rôle dans la stabilisation du T6SS au niveau du peptidoglycane en l'absence de la protéine structurale TssJ (Reglinski et al., 2023).

Chez les T6SS du groupe i4b, la protéine **TagX**, une L,D-endopeptidase de la membrane interne est prédite comme réalisant une étape essentielle de dégradation du peptidoglycane permettant l'assemblage du complexe membranaire (Kandolo et al., 2023; Weber et al., 2016).

Les protéines accessoires **TagA** (TsmA) et **TagB/J** (TsmB) stabilisent la protéine TssA lors de l'assemblage des T6SS (Bernal et al., 2021). Il existe deux formes de TssA, une courte (TssA_s) et une longue (TssA_L). TssA_L interagit avec TagA et TssA_s interagit avec TagB. Les bactéries possédant le mécanisme de stabilisation TssA_L-TagA (T6SS i1, i2) maintiennent leur T6SS en position armée pendant plusieurs minutes, tandis que celles qui possèdent le mécanisme de stabilisation TssA_s-TagB/J (T6SS i3, i4b et i5) subissent une contraction immédiate de la gaine contractile (Bernal et al., 2021).

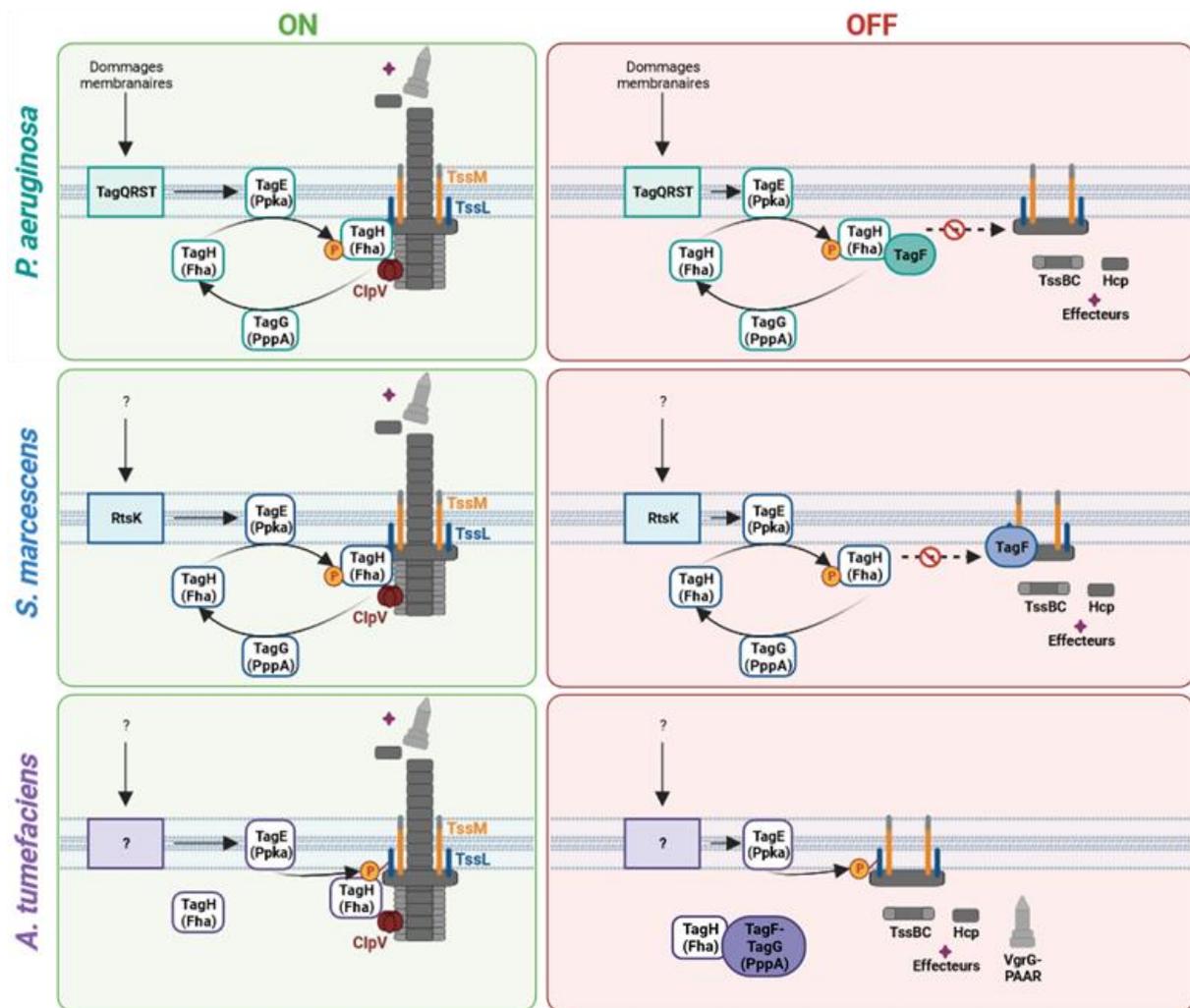


Figure 14. Implication des protéines accessoires (Tag) dans la régulation post-traductionnelle du T6SS. Chez *P. aeruginosa*, *S. marcescens* et *A. tumefaciens*, certaines protéines accessoires sont impliquées dans la voie de phosphorylation des thréonines (TPP). Dans cette voie, la kinase membranaire TagE (PpkA) initie la cascade de phosphorylation par la dimérisation et l'autophosphorylation de son résidu sérine conservé, puis par la phosphorylation d'un résidu thréonine d'une protéine cytoplasmique cible qui va entraîner l'assemblage du T6SS. L'activation de la voie TPP chez *P. aeruginosa* fait intervenir le complexe de détection périplasmique TagQRST en réponse à des dommages membranaires. Ce système comprend la protéine de la membrane externe TagQ et le régulateur périplasmique TagR. L'association de TagQ et TagR entraîne la phosphorylation d'un transporteur de type ABC (TagTS) qui active alors PpkA (TagE). Chez *S. marcescens*, la voie TPP est activée par un signal inconnu détecté par la protéine périplasmique RtsK qui active alors PpkA (TagE). Chez ces deux espèces, l'activation de PpkA (TagE) entraîne la phosphorylation de Fha (TagH) qui induit l'assemblage du T6SS. La déphosphorylation de Fha (TagH) par PppA (TagG) inhibe l'assemblage du T6SS. Chez *A. tumefaciens*, PpkA (TagE) phosphoryle TssL, ce qui est fondamental pour la formation du complexe TssML. L'interaction entre Fha (TagH) et TssL phosphorylée est nécessaire à l'assemblage du T6SS. La régulation post-traductionnelle fait aussi intervenir la protéine TagF qui régule négativement l'assemblage du T6SS. Chez *P. aeruginosa*, TagF séquestre Fha (TagH) pour empêcher l'assemblage du T6SS. Chez *S. marcescens*, TagF empêcherait la formation du complexe membranaire en s'associant avec TssM. Chez *A. tumefaciens*, c'est la protéine chimérique TagF-PppA qui inhibe l'assemblage du T6SS en se fixant à Fha (TagH). D'après Hespanhol et al., 2023; Lin et al., 2023; Ostrowski et al., 2018.

Régulation post-traductionnelle

Certaines protéines accessoires peuvent être impliquées dans la régulation post-traductionnelle du T6SS. C'est le cas par exemple des protéines **TagEGH** impliquées dans la voie de phosphorylation des thréonines (TPP) chez plusieurs organismes (Basler et al., 2013; Lin et al., 2018; Mougous et al., 2007). Les TPP sont activées par des signaux extérieurs. Lorsque les signaux sont détectés, ces derniers activent la protéine kinase PpkA (TagE). Une fois activée, PpkA phosphoryle Fha (TagH), ce qui active l'assemblage du T6SS. Ce système fait également intervenir la phosphatase PppA (TagG) qui déphosphoryle Fha, réprimant ainsi l'assemblage du T6SS. Ce système est notamment retrouvé chez *P. aeruginosa*, *A. tumefaciens* et *S. marcescens* (**Figure 14** ; Lin et al., 2014; Lin et al., 2018). La régulation post-traductionnelle peut également faire intervenir la protéine TagF. Chez *P. aeruginosa*, TagF séquestre Fha pour empêcher l'activation de l'assemblage du T6SS tandis que chez *A. tumefaciens*, TagF est fusionnée à PppA et les deux domaines bloquent l'assemblage du T6SS de manière indépendante (Lin et al., 2018). Chez *S. marcescens*, TagF empêcherait la formation du complexe membranaire en interagissant avec TssM (Ostrowski et al., 2018).

L'activation de la voie TPP chez *P. aeruginosa* fait intervenir le complexe de détection périplasmique **TagQRST** en réponse à des attaques extérieures (Basler et al., 2013; Casabona et al., 2013). Ce système comprend la protéine de la membrane externe TagQ et le régulateur périplasmique TagR. L'association de TagQ et TagR entraîne la phosphorylation d'un transporteur de type ABC (TagTS) qui active alors PpkA (TagE) (Basler et al., 2013; Casabona et al., 2013). Chez *S. marcescens*, la protéine RtkS active la voie des PTT mais le signal activant RtkS n'a encore pas été identifié (Ostrowski et al., 2018).

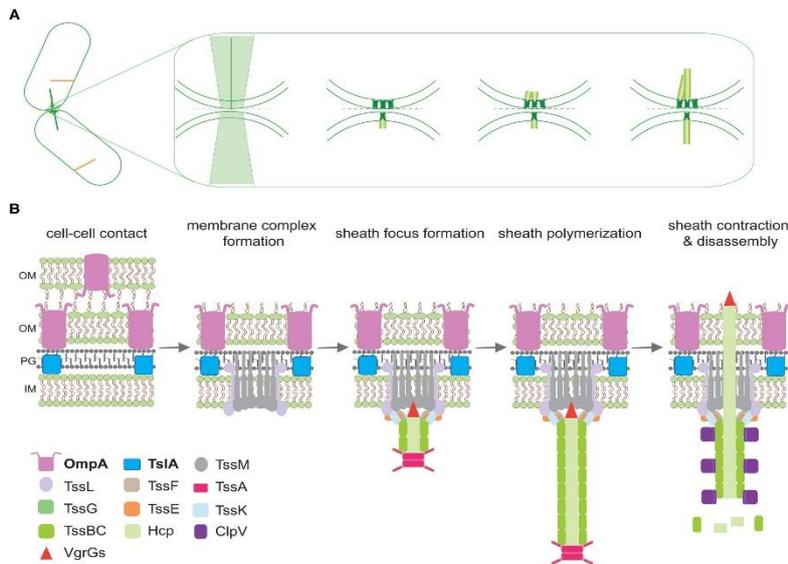


Figure 15. Modèle d'assemblage du T6SS dépendant du contact. (A) Chez *Acinetobacter* et *B. thailandensis*, les cellules en contact étroit avec d'autres cellules peuvent initier la formation d'un complexe membranaire suivi de l'assemblage de quelques anneaux de la gaine au site de contact (i.e. foci). Plusieurs complexes membranaires peuvent se former sur le même site de contact, ce qui peut entraîner plusieurs assemblages de gaines simultanément. (B) Les cellules détectent le contact avec des cellules proximales par le biais d'une cascade dépendante de la présence de TslA et

OmpA. L'interaction possible de TslA avec TssM déclenche l'assemblage du complexe membranaire et de la plateforme d'assemblage, suivi de la formation de quelques anneaux de la gaine. TssA est positionnée à l'extrémité distale de la gaine contractile pour une polymérisation ultérieure faisant suite à un signal encore inconnu. Le tube Hcp et la pointe VgrG associés à des effecteurs sont propulsés hors de la cellule lors de la contraction de la gaine. L'ATPase ClpV désassemble ensuite la gaine contractée.

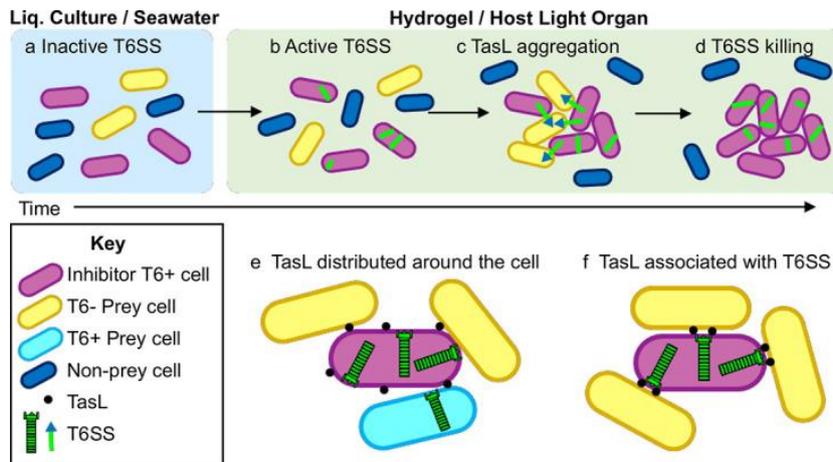


Figure 6. Modèles prédictifs de la coordination de TasL et du T6SS chez *Vibrio fischeri* ES401 dans la sélection des proies en milieu hydrogel. Les cellules inhibitrices codant un T6SS fonctionnel (magenta, T6+) expriment TasL (points noirs) et des seringues de T6SS (vert), tous deux nécessaires pour établir un contact avec les cellules proies (jaune et cyan) et les éliminer, tandis que les cellules non-proies (bleu foncé)

sont exclues des agrégats et ne sont pas tuées. (a à d) Chronologie de l'activité du T6SS et de l'agrégation médiée par TasL. (a) Les cellules en culture liquide ou en eau de mer sont physiquement dispersées, et le T6SS/TasL est inactif. (b) Lorsque les cellules passent dans un hydrogel ou s'associent à l'hôte, les conditions de forte viscosité favorisent l'expression du T6SS et de TasL ainsi que l'assemblage de la gaine. (c et d) Les cellules forment ensuite des agrégats médiés par TasL, fournissant le contact cellulaire nécessaire pour l'élimination des proies. La formation d'agrégats est cible spécifique ce qui sous-entend une implication de TasL dans la reconnaissance des cellules cibles. (e et f) Localisation potentielle de TasL sur les cellules inhibitrices. (e) Distribution aléatoire de TasL à la surface des cellules inhibitrices ; (f) Colocalisation de TasL avec les structures du T6SS. D'après Speare et al., (2022).

Régulation spatio-temporelle

La protéine **TslA** du T6SS i4b et la porine OmpA sont impliquées dans la localisation du T6SS au point de contact entre les cellules chez *A. baylyi*, *A. baumannii* et *B. thailandensis* (Li et al., 2019; Lin et al., 2022; Lin et al., 2023). À l'aide de techniques de microscopie, Lin et al. (2023) ont observé la formation de foci de la gaine à la périphérie des bactéries. La formation de foci nécessite la présence du complexe membranaire et de la plateforme d'assemblage. Leur formation précède la polymérisation et la contraction de la gaine contractile (Lin et al., 2023). Les auteurs ont observé que 50% des gaines contractiles assemblées l'étaient à partir des foci localisés au point de contact entre les cellules. La formation de ces foci au point de contact dépend de la présence de la protéine TslA (localisée à la périphérie des cellules) et est fortement réduite en l'absence de la porine OmpA. Un nouveau modèle de régulation de l'assemblage du T6SS est alors proposé (**Figure 15**) : la protéine OmpA, en reconnaissant un contact cellulaire, activerait la protéine TslA. Cette dernière recruterait ensuite le complexe membranaire pour l'assemblage d'un T6SS. Étonnamment, la formation des foci au point de contact ne conduit pas toujours à la polymérisation de la gaine contractile, ce qui impliquerait une étape de régulation supplémentaire. Ce système de reconnaissance et d'assemblage au point de contact semble conservé au niveau du groupe i4b, auquel appartient le T6SS de *S. rhizophila*. Des homologues de TslA sont identifiés dans 80 % (n= 281) des T6SS du groupe i4b que les auteurs ont analysé (Lin et al., 2023).

Reconnaissance des cellules cibles

La lipoprotéine putative **TasL** associée au T6SS i1 de *V. fischeri* ES401 est impliquée dans la reconnaissance des cellules cibles (Speare et al., 2022). TasL favorise la formation d'agrégats avec les cellules cibles afin de promouvoir le contact nécessaire au fonctionnement du T6SS. La formation d'agrégat n'intervient toutefois pas avec toutes les espèces cibles, suggérant un rôle de TasL dans la reconnaissance de cibles spécifiques (**Figure 16** ; Speare et al., 2022). La structure prédite de TasL suggère qu'elle serait fixée à la membrane externe grâce à sa partie N-terminale, tandis que sa partie C-terminale serait située à l'extérieur de la cellule, ce qui lui permettrait d'adhérer aux cellules cibles (Speare et al., 2022). La présence de lipoprotéines putatives est détectée chez d'autres espèces bactériennes comme *X. citri* pv. *citri*, *Dyella thiooxydans* et *Myxococcus xanthus* (Chang et al., 2017; Speare et al., 2022).

b. Structure des T6SS non canoniques (T6SS^{ii-iv})Sous-type ii : T6SSⁱⁱ

Le sous-type ii a été mis en évidence chez le genre *Francisella* (Bröms et al., 2010; Clemens et al., 2015). Ces T6SS ont une structure similaire aux T6SS canoniques et sont composés d'un complexe membranaire, d'une plateforme d'assemblage (à noter que les composants ne sont pas encore tous identifiés), une aiguille et une gaine contractile. Bien que l'architecture soit similaire, les composants structuraux partagent très peu d'homologie avec les composants des T6SS canoniques à l'exception des protéines Hcp. Des effecteurs potentiels associés au T6SSⁱⁱ de *Francisella tularensis* ont été identifiés et la plupart seraient spécifiques de ce genre bactérien (Eshraghi et al., 2016).

Sous-type iii : T6SSⁱⁱⁱ

Les T6SSⁱⁱⁱ sont exclusifs au phylum des Bacteroidetes (Russell et al., 2014). Ils partagent les mêmes composants structuraux que les T6SS canoniques mis à part l'absence du complexe membranaire TssJLM et de la protéine TssA. Chez les T6SSⁱⁱⁱ, le complexe membranaire est composé de cinq protéines TssNQOPR (Bongiovanni et al., 2024). Des analyses de génomique comparative ont révélé trois architectures génétiques distinctes des T6SS chez les Bacteroidales : GA1, GA2 et GA3-T6SS (Coyne et al., 2016). Contrairement aux T6SSⁱ qui codent généralement un seul gène *hcp*, les T6SS des Bacteroidetes codent pour de multiples *hcp* avec 2 *hcp* pour le GA1-T6SS, 6 *hcp* pour le GA2-T6SS et 5 *hcp* pour le GA3-T6SS (Coyne et al., 2016). Les GA1-T6SS et GA2-T6SS sont codés au niveau d'éléments intégratifs et conjugatifs (ICE), permettant leurs transfert et leur dispersion aux sein des espèces de Bacteroidetes (Coyne et al., 2014; Coyne et al., 2016). Alors que les composants structuraux divergent des T6SS canoniques, les effecteurs identifiés à ce jour possèdent des homologies de séquence avec d'autres effecteurs du T6SSⁱ. Par exemple, des homologues à Tfe1, un effecteur impliqué dans la compétition inter-bactérienne chez *Flavobacterium johnsoniae*, ont été identifiés chez *Acinetobacter* et *E. coli* (Russell et al., 2014).

Sous-type iv : T6SS^{iv}

Ce sous-type a été mis en évidence chez le symbionte obligatoire d'amibes, *Amoebophilus asiaticus* qui utilise son T6SS pour infecter son hôte (Böck et al., 2017). Similairement aux T6SSⁱ, les T6SS^{iv} sont composés de quatre structures distinctes : un système d'ancrage à la membrane interne (dépourvu du complexe membranaire TssJLM permettant l'ancrage à la membrane externe), une aiguille et une gaine contractile. Ces composants structuraux partagent peu, voire aucune homologie avec les composants des T6SS canoniques et pourraient avoir émergé de phages de manière indépendante des autres T6SS (Denise et al., 2020). Par des approches de cryotomographie électronique, Böck et al. (2017) ont observé que les T6SS au sein des bactéries étaient organisés en paquets, allant de 2 à 34 T6SS, avec une moyenne de 8 T6SS par paquet. Les chercheurs ont noté que 85% des cellules bactériennes contenaient en général 1 à 2 paquets et que la contraction des T6SS formant ces paquets n'était pas coordonnée (Böck et al., 2017).

3. Distribution des T6SS

a. Distribution

Les T6SS sont détectés dans 12 phyla bactériens sur 74 phyla décrits à ce jour (**Figure 17** ; Hug et al., 2016). Le T6SSⁱ est le plus largement distribué au sein des bactéries Gram-négatives (Abby et al., 2016; Zhang et al., 2023). Le T6SSⁱⁱ n'est détecté qu'au niveau des Gammaprotéobactéries et plus spécifiquement chez le genre *Francisella* (Russell et al., 2014). Le T6SSⁱⁱⁱ est détecté seulement au niveau des Bactéroidètes (García-Bayona et al., 2021). Finalement, des homologues aux protéines structurales du T6SS^{iv} ont été détectés dans 6 phyla bactériens distincts (Böck et al., 2017).

	T6SS			
	i	ii	iii	iv
Gammaproteobacteria	+	+	-	+
Betaproteobacteria	+	-	-	+
Alphaproteobacteria	+	-	-	+
Epsilonproteobacteria	+	-	-	-
Deltaproteobacteria	+	-	-	+
Deferribacteres	+	-	-	-
Acidobacteria	+	-	-	-
Nitrospirae	+	-	-	-
Planctomycetes	+	-	-	-
Bacteroidetes	-	-	+	+
Gemmatimonates	+	-	-	-
Cyanobacteria	-	-	-	+

Figure 17. Présence et absence des sous-types de T6SS à travers les différents phyla bactériens (Unni et al., 2022).

Les T6SS sont très largement distribués au sein des bactéries Gram-négatives avec plus de 17000 clusters distribués dans plus de 7700 séquences génomiques (SecReT6 v3, Zhang et al., 2023). Dans une étude menée par Abby et al. (2016), une recherche des gènes codant les protéines structurales des T6SS a été réalisée sur 1 528 génomes complets de bactéries Gram-négatives. Au total, 652 T6SSⁱ ont été détectés dans 409 génomes bactériens. Les bactéries peuvent en effet posséder plusieurs T6SS. Certaines souches de l'espèce *Burkholderia pseudomallei* possèdent par exemple jusqu'à six T6SSⁱ. La grande majorité des T6SS (91 %) sont organisés en un seul cluster. Dans 35 % des cas, des clusters composés des gènes *vgrG*, *paar* et

hcp sont détectés à distance du cluster principal qui intègre les autres gènes de structure. Ils sont alors qualifiés de *hcp*, *vgrG* ou *paar* orphelins. Il est intéressant de noter que certains génomes dépourvus de T6SS possèdent des clusters *hcp*, *vgrG* ou *paar* orphelins (Abby et al., 2016).

Concernant le sous-type ii, 30 T6SSⁱⁱ ont été détectés dans 18 génomes de *Francisella*, et tous les génomes de *Francisella* analysés codent au moins un T6SSⁱⁱ qui semble donc conservé au sein de ce genre bactérien. Pour le sous-type T6SSⁱⁱⁱ, 18 génomes de Bactéroidètes sur 97 en possèdent un, avec un total de 20 T6SSⁱⁱⁱ détectés (Abby et al., 2016).

b. T6SS plasmidiques

Si la vaste majorité des T6SS sont localisés sur les chromosomes bactériens, certains T6SS peuvent se trouver sur les plasmides. Les gènes codant pour les protéines structurales du T6SSⁱ ont été détectés dans 330 plasmides (sur 30660 replicons analysés), dont 120 sont de nature conjugative ou mobilisable (Morgado and Vicente, 2022). Parmi ces plasmides, 328 sur 330 proviennent de Protéobactéries, tandis que les deux autres appartiennent à une Acidobactérie et une Gemmatimonadètes. Parmi les bactéries portant un T6SS plasmidique, 69% ont été isolées de l'environnement (sols, racines, graines, plantes, eau et sources alimentaires). De plus, 78 % de bactéries possédant un T6SS plasmidique ne possèdent pas de T6SS chromosomique. L'ensemble des T6SS détectés sur les plasmides appartiennent au sous-type i. Certaines espèces bactériennes peuvent héberger des plasmides contenant des T6SSⁱ de plusieurs groupes, comme *Rhizobium* (i1, i3 et i5), *Rahnella* (i1, i2 et i4b), *Paraburkholderia* (i2, i3, i4a et i4b) et *Azospirillum* (i1, i4a et i5). Les plasmides des *Campylobacteraceae* sont, quant à eux, exclusivement associés à des T6SS du groupe i1. L'analyse phylogénétique des T6SS associés aux plasmides a également révélé la présence d'un sous-groupe i3 qui semble être spécifique aux T6SS plasmidiques (Morgado and Vicente, 2022).

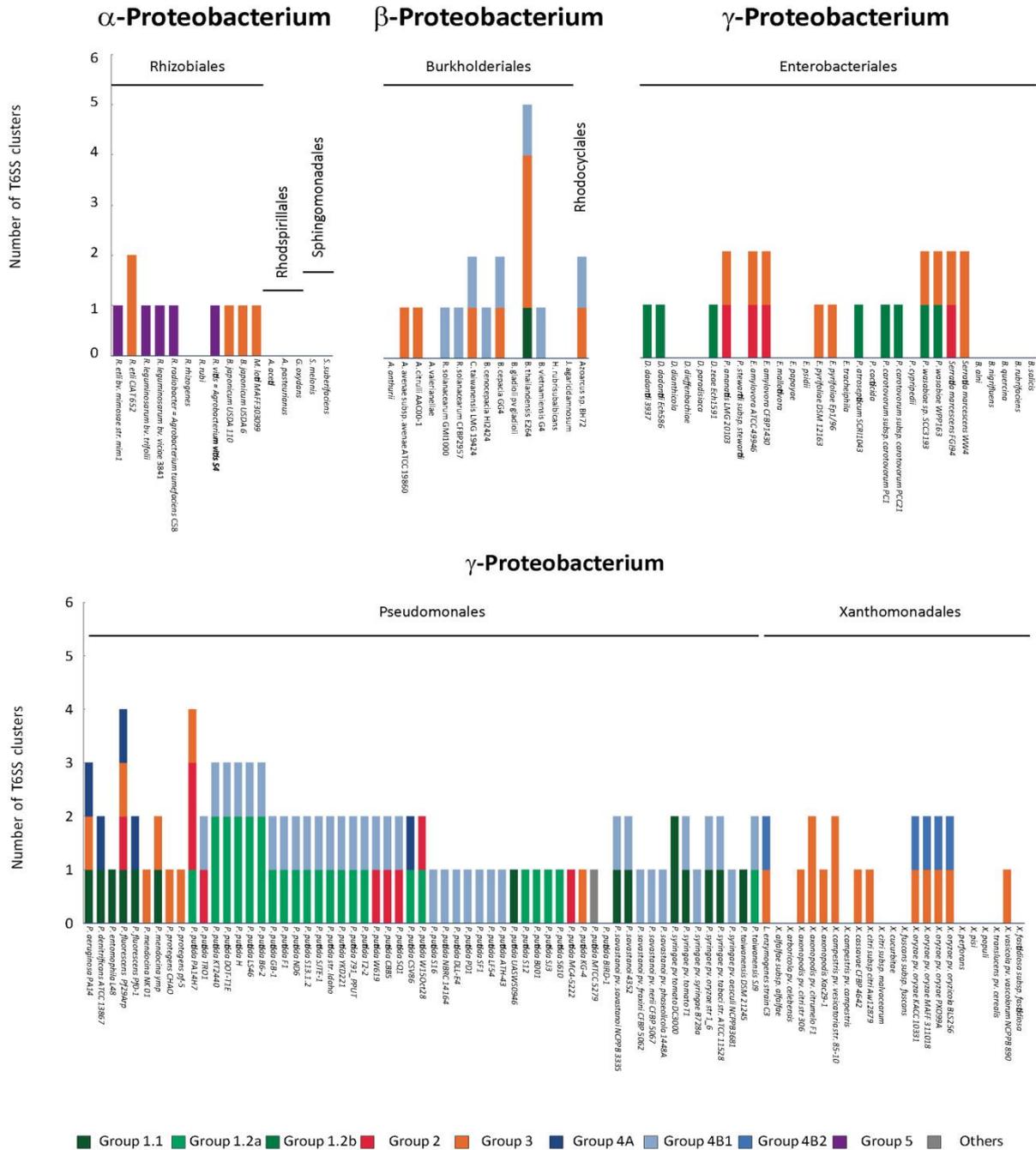


Figure 18. Distribution des T6SS chez les bactéries associées aux plantes. Les bactéries sont réparties en α -, β - et γ -protéobactéries. Les groupes T6SS sont représentés par des couleurs différentes en fonction de leurs groupes phylogénétiques : groupe 1 (vert), groupe 2 (rouge), groupe 3 (orange), groupe 4 (bleu) et groupe 5 (violet). Les groupes phylogénétiques ont été attribués à partir d'un arbre construit avec la méthode de maximum de vraisemblance (1000 bootstraps) obtenu d'après les séquences protéiques des gènes *tssB*. D'après Bernal et al., (2018).

c. T6SS chez les bactéries associées aux plantes

Les T6SS sont très largement distribués au sein des Pseudomonadota associées aux plantes (Bernal et al., 2018). En effet, 73% des génomes analysés (104 sur 143) contiennent au moins un T6SS (**Figure 18**). Au total, 170 clusters T6SS sont détectés dans 104 génomes avec 7% des génomes contenant plus de deux T6SS. Certaines souches bactériennes peuvent posséder jusqu'à 5 T6SS (i.g. *B. thailendensis* E364). Dans la majorité des cas, lorsqu'une bactérie possède plusieurs T6SS, ceux-ci appartiennent à des groupes phylogénétiques différents. Le groupe i1.1 est spécifique au genre *Pseudomonas*. Le groupe i1.2 est subdivisé en deux branches : les T6SS appartenant aux *Pseudomonas* (i1.2a) et ceux appartenant aux *Dickeya* et *Pectobacterium* (i1.2b). De la même manière, le groupe i4b comprend deux branches : une spécifique aux *Pseudomonas* (i4b1) et une autre regroupant les T6SS des genres *Azoarcus*, *Xanthomonas*, *Ralstonia* et *Burkholderia* (i4b2). Les T6SS du groupe i2 sont détectés dans divers genres incluant les *Pseudomonas*, *Erwinia*, *Serratia* et *Pantoea*. Le groupe i3 est détecté dans pratiquement tous les genres bactériens analysés et est donc le plus largement distribué contrairement au groupe i5 qui est spécifique au genre *Rhizobium* (Bernal et al., 2018).

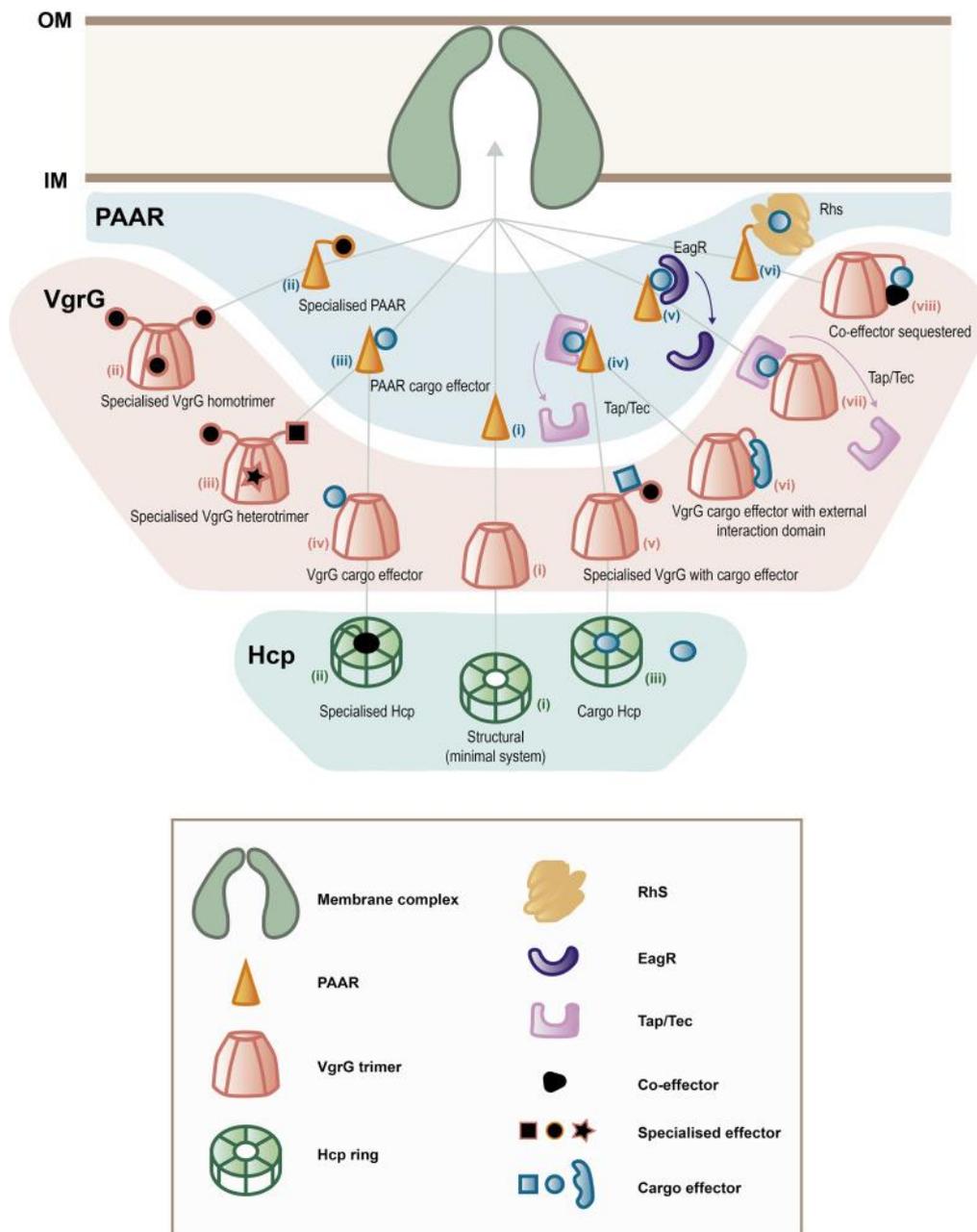


Figure 19. Modes de couplage des effecteurs aux composants structuraux du T6SS (d'après Allsopp et Bernal, 2023). Modèle représentant la variabilité rencontrée lors de l'assemblage des composants de l'aiguille, c'est-à-dire la pointe composée du cône PAAR et du trimère VgrG et le tube interne Hcp. Lors de la formation de l'aiguille, une seule protéine PAAR (fond bleu) est chargée par trimère de VgrG (fond rouge) puis les anneaux hexamériques Hcp (fond vert) sont ajoutés. Les flèches grises représentent les liaisons et les chargements étape par étape et ne sont pas des chemins restrictifs. Deux classes principales d'effecteurs sont représentées : les effecteurs spécialisés correspondant à des domaines toxiques de Hcp, VgrG ou PAAR et les effecteurs cargo qui interagissent de manière non-covalente avec les composants de l'aiguille soit directement, soit indirectement avec l'aide d'adaptateurs. Les flèches roses représentent les chaperonnes/adaptateurs (Eag/Tec/Tap) nécessaires au chargement des effecteurs cargo (les adaptateurs ne sont pas sécrétés avec les effecteurs).

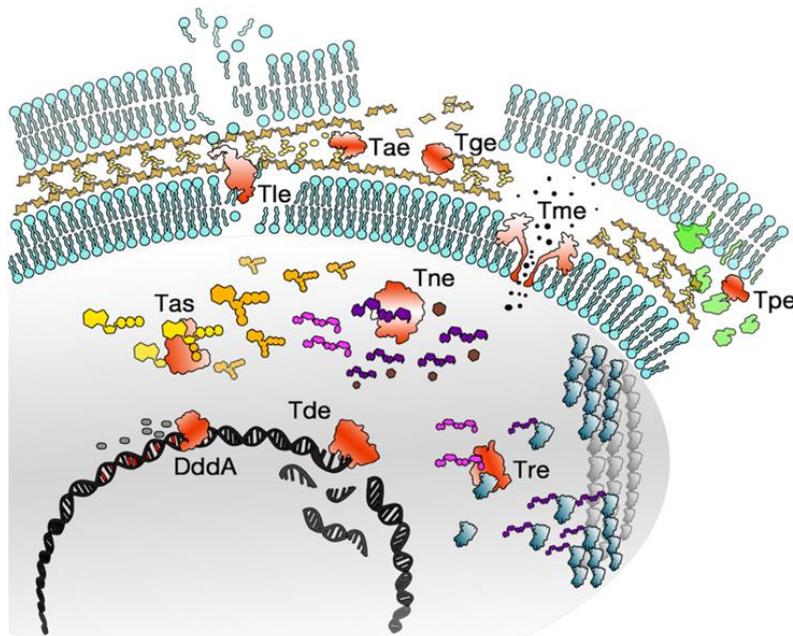
4. Effecteurs du T6SS

a. Chargement des effecteurs

Les effecteurs du T6SS sont associés aux composants de l'aiguille (Hcp, VgrG et PAAR) afin d'être relargués dans les cellules cibles à la suite de l'évènement de tir. Il existe deux grandes classes d'effecteurs : les **effecteurs spécialisés** qui sont des protéines Hcp, VgrG et PAAR contenant des domaines toxiques additionnels et les **effecteurs cargo** qui sont des protéines indépendantes liées aux composants de l'aiguille de manière directe ou indirecte grâce à des adaptateurs (Tap) ou protéines chaperonnes (Tec) (**Figure 19**). Les gènes codants les effecteurs sont organisés en opéron avec les gènes codant leurs véhicule (*hcp*, *vgrG* ou *paar*), leur adaptateurs (s'il y en a) et leur protéine d'immunité associée dans le cas des toxines antibactériennes (**i.g. voir Figure 21**). Ces opérons peuvent être localisés au sein des clusters T6SS contenant les gènes de structure mais peuvent également être dispersés dans les génomes en tant que clusters *hcp*, *vgrG* ou *paar* orphelins.

Contrairement aux effecteurs associés aux protéines VgrG et PAAR, les effecteurs associés à Hcp ont un faible poids moléculaire (<20 kDa). En effet, le tube Hcp est entouré par la gaine contractile. Les effecteurs qui lui sont associés se trouvent donc à l'intérieur du tube dont le diamètre est d'environ 40Å et sont donc limités en taille (Hernandez et al., 2020; Ma et al., 2017a).

Comme mentionné dans la partie III.2.a, la pointe de l'aiguille est composée d'un trimère de protéines VgrG. Le trimère VgrG peut être assemblé à partir de différents VgrG (VgrG structuraux, VgrG spécialisés et/ou VgrG associés à des effecteurs cargo). Ainsi, de multiples combinaisons d'assemblage sont possibles (**Figure 19**).



Localisation cible	Effecteur	Fonction
Périplasm	Tle Type 6 Lipase Effector	Dégradation des phospholipides membranaires
	Tae Type 6 Amidase Effector	Dégradation du peptidoglycane par des activités amidase hydrolase
	Tge Type 6 Glycoside hydrolase Effector	Dégradation du peptidoglycane par des activités glycoside hydrolase
	Tme Type 6 Membran-disrupting Effector	Formation de pores dans la membrane interne entrainant une dépolariation
	Tpe Type 6 Peptidase Effector	Hydrolyse l'ancrage lipidique des lipoprotéines de la membrane externe
Cytoplasme	Tas Type 6 Effector (p)ppApp Synthetase	Phosphorylation de l'ATP et l'ADP entrainant une accumulation de (p)ppApp
	Tne Type 6 NADase Effector	Dégradation du NAD(P)+ en nicotinamide et ADP-ribose entrainant l'épuisement des réserves cellulaires en NAD(P)+
	Tde Type 6 DNase et RNase Effector	Catalyse l'hydrolyse des acides nucléiques
	DddA DS-DNA Deaminase toxin A	Désamination de la cytosine en uracile dans l'ADNdb
	Tre Type 6 ADP-Ribosyltransferase Effector	Transfert l'ADP-ribose sur des cibles protéiques lors de l'hydrolyse du NAD+
Environnement	Tie Type 6 Metal Ion acquisition Effector	Facilite l'acquisition d'ion métallique
Non identifiée	Tse Type 6 Secretion System Effector	Non identifiée

Figure 20. Les classes d'effecteurs T6SS et leurs cibles moléculaires. Onze classes d'effecteurs associés aux T6SS ont été identifiées. Ces effecteurs peuvent agir au niveau de cibles périplasmiques, cytoplasmiques ou au niveau de l'environnement. Le schéma illustre l'activité des effecteurs au niveau de cibles cellulaires. Les effecteurs agissant au niveau du milieu extérieur ne sont pas illustrés. D'après Jurénas and Journet, 2021; Zhang et al., 2023.

b. Description des effecteurs et de leurs cibles

Les classes d'effecteur et leurs cibles moléculaires

Plusieurs classes d'effecteurs ont été identifiées expérimentalement et se distinguent par leur cible et leur mode d'action (**figure 20** ; Jurénas and Journet, 2021) :

Certains effecteurs agissent au niveau du périplasma et ciblent les composants des membranes lipidiques ou ceux du peptidoglycane. Ainsi, les lipases **Tle** dégradent les phospholipides membranaires, les peptidases **Tpe** hydrolysent l'ancrage lipidique des lipoprotéines de la membrane externe et les effecteurs **Tme** forment des pores dans la membrane interne entraînant alors une dépolarisation. Les amidase hydrolases **Tae** et les glycoside hydrolases **Tge** dégradent quant à elles le peptidoglycane.

D'autres effecteurs ciblent des composants présents au niveau du cytoplasme des cellules cibles. Ils peuvent alors avoir une activité contre les acides nucléiques comme les **Tde** (DNase et RNase) qui catalysent l'hydrolyse des acides nucléiques ou les **Ddda** qui désaminent les cytosines en uracile au niveau de l'ADN double brin. D'autres effecteurs agissent au niveau de la machinerie cellulaire. C'est le cas des NADases **Tne** qui entraînent des bactériostases suite à l'épuisement des réserves cellulaires en NAD(P)⁺ ou encore des ADP-ribosyltransférase **Tre** qui inhibent la division cellulaire en modifiant le cytosquelette grâce à l'addition d'ADP-ribose.

Certains effecteurs ne ciblent pas directement d'autres cellules, mais sont sécrétés dans l'environnement. Ils peuvent alors jouer un rôle dans l'acquisition de ressources nutritives en se liant à des vésicules membranaires, comme c'est le cas de **TeoL** chez *Capriavidus necator* (Li et al., 2022) ou agir comme des chélateurs d'ions métalliques (**Tie**).

Le cas des PAAR spécialisés

Certains PAAR spécialisés font partie de la classe des effecteurs Rhs (Rearrangement hot spot) (**Figure 21**). Ces effecteurs Rhs sont composés d'un domaine PAAR en N-ter, d'un domaine Rhs et d'un domaine toxique en C-ter (PAAR-Rhs-CT). Ils sont très largement distribués au sein des bactéries Gram-négatives avec plus de 2500 PAAR-Rhs-CT détectés dans pas moins de 140 espèces bactériennes différentes (Ma et al., 2017b). Les PAAR-Rhs-CT présentent une diversité de domaines toxiques en C-ter considérable qui peuvent être classés en huit catégories :

DNase, RNase, désaminase, endonucléase, peptidase, formation de pores, modification de protéines et fonction inconnue (Ma et al., 2017b).

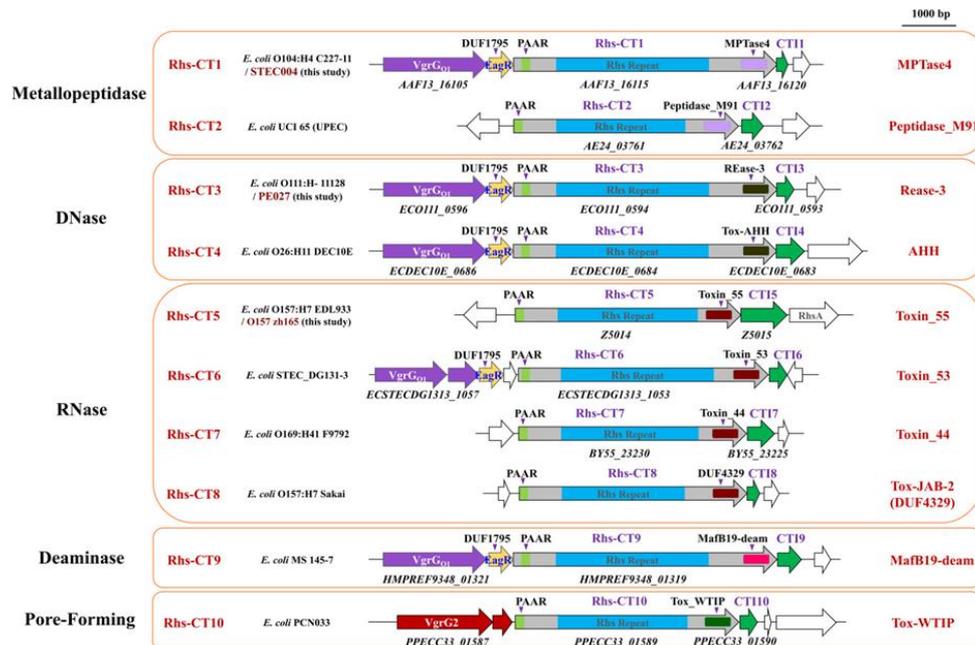


Figure 21. Diversité des PAAR-Rhs-CT chez l'espèce *E. coli*. Les effecteurs (Rhs-CT) du T6SS sont organisés en opéron avec leur véhicule (VgrG ou domaine PAAR), leur adaptateurs (EagR) et leur protéine d'immunité (CTI). Les effecteurs PAAR-Rhs-CT sont composés d'un domaine PAAR en N-ter, d'un domaine Rhs et d'un domaine toxique en C-ter. Une grande diversité de domaines toxiques sont détectés au niveau des PAAR-Rhs-CT des *E. coli* : métallopeptidase, DNase, RNase, Désaminase et formation de pores. D'après Ma et al., (2017b).

c. Effecteurs anti-procaryotes

Il est difficile d'être exhaustif sur les effecteurs anti-procaryotes décrits dans la littérature. En effet, ces derniers sont très nombreux et ont des activités très diverses. Certains effecteurs montrent toutefois des activités particulières qui nécessitent d'être introduites afin de mieux comprendre les différents rôles que peuvent avoir les effecteurs associés au T6SS.

Certains effecteurs du T6SS peuvent avoir une activité antibactérienne sans nécessiter leur translocation dans les cellules cibles (Song et al., 2021). C'est le cas par exemple de Tce1, une DNase dépendante du Ca^{2+} et Mg^{2+} sécrétée par le T6SS de *Yersinia pseudotuberculosis*. Cet effecteur montre des activités antibactériennes lorsqu'il est sécrété dans le milieu extérieur. En effet, Tce1 a la particularité de pouvoir entrer dans le cytosol des cellules cibles en interagissant avec les récepteurs des vésicules de la membrane externe, ButB et OmpF (Song et al., 2021). Le T6SS de *Y. pseudotuberculosis* peut également transloquer Tce1 dans les cellules cibles de manière dépendante du contact et indépendante de ces récepteurs. Cette

dualité dans les mécanismes de translocation confère au T6SS de *Y. pseudotuberculosis* une efficacité non seulement sur des surfaces solides et des biofilms, mais aussi dans des milieux liquides (Song et al., 2021). Il convient de noter cependant que l'internalisation par les cellules cibles n'est pas universelle, puisque Tce1 peut entrer dans le cytosol d'*Escherichia coli* et *Salmonella Typhimurium*, mais pas dans celui de *Salmonella enteritidis*, *Acinetobacter baumannii*, ou *Corynebacterium glutamicum* (Song et al., 2021).

Effecteurs ciblant les bactéries Gram-positives

Les bactéries Gram-positives sont des monodermes dont l'enveloppe est composée d'une couche épaisse de peptidoglycane (PDG). Cette couche de PDG était décrite comme imperméable aux T6SS. Toutefois le T6SS de *P. chlororaphis* est capable d'induire la sporulation chez *Bacillus subtilis*, un mécanisme de défense employé par la bactérie en condition de survie (Molina-Santiago et al., 2019). Une peptidoglycane hydrolase de la famille des muramidases (Tse1) a récemment été identifiée comme responsable de l'activation de la sporulation de *B. subtilis* qui répond à l'hydrolyse de son PDG par Tse1 en activant ce mécanisme de défense (Pérez-Lorente et al., 2023). *Acinetobacter baumannii* sécrète également un effecteur (Tse4) qui est toxique envers diverses espèces Gram-positives telles que *Bacillus subtilis*, *Listeria monocytogenes*, et *Staphylococcus aureus* (Le et al., 2021). Cette toxicité est due à ses activités lytiques transglycosylase et endopeptidase qui dégradent le PDG des bactéries monodermes (Le et al., 2021). Des orthologues de Tse4 ont été détectés chez des espèces appartenant au genre *Acinetobacter*, *Klebsiella*, *Yersinia*, et *Enterobacter* (Le et al., 2021). Les bactéries Gram-positives sont donc perméables aux T6SS et peuvent être sensibles à des effecteurs ciblant le PDG. *Bacillus subtilis* est aussi sensible à un effecteur PAAR-Rhs-CT de type DNase injecté par le T6SS d'*A. citrulli* (Pei et al., 2022), démontrant la sensibilité des bactéries Gram-positives à des effecteurs ciblant des composants cytoplasmiques.

d. Effecteurs anti-eucaryotes

Les effecteurs anti-eucaryotes ciblent des cellules fongiques ou animales (Monjarás Feria and Valvano, 2020; Trunk et al., 2019). Ils peuvent jouer un rôle crucial dans la pathogénicité des bactéries en perturbant les processus cellulaires des cellules hôtes ou être impliqués dans les

compétitions intermicrobiennes. Il est à noter qu'à ce jour, aucun effecteur du T6SS n'a été décrit comme ciblant les cellules végétales.

Effecteurs antifongiques

L'activité antifongique de certains effecteurs associés aux T6SS a été mis en évidence pour la première fois en 2018 par Trunk et al. qui ont identifié deux effecteurs, Tfe1 et Tfe2, aux propriétés antifongiques chez *Serratia marcescens* (Trunk et al., 2018). Alors que Tfe1 provoque une perte du potentiel membranaire, Tfe2 perturbe la capacité des cellules fongiques à absorber les nutriments et altère le métabolisme des acides aminés. En conséquence, Tfe2 induit la réponse cellulaire d'autophagie, un processus par lequel les cellules dégradent et recyclent leurs propres composants pour maintenir leur survie en cas de stress ou de carence en nutriments (Trunk et al., 2018). Des homologues à ces deux effecteurs sont détectés chez d'autres protéobactéries de l'ordre des *Enterobacterales*, *Burkholderiales*, *Pseudomonadales* et *Vibrionales* (Trunk et al., 2019). Récemment, une DNase aux propriétés antifongiques, TafE, a été décrite chez *Acinetobacter baumannii* 17978 (Luo et al., 2023). TafE peut également dégrader l'ADN bactérien car son expression ectopique chez *E. coli* est toxique pour la cellule. Il peut donc être considéré comme un effecteur interrègne. En revanche, au niveau des cellules eucaryotes, TafE n'est pas internalisé au niveau du noyau des cellules de mammifère. Il semble donc avoir évolué pour cibler spécifiquement les cellules fongiques (Luo et al., 2023).

Effecteurs anti-animal

De nombreux effecteurs sont décrits comme ciblant des cellules animales (Monjarás Feria and Valvano, 2020). Par exemple, *Burkholderia cenocepacia* est un agent pathogène opportuniste qui provoque des infections pulmonaires chroniques graves chez les patients atteints de mucoviscidose. Alors que *B. cenocepacia* possède un cluster T6SS au niveau de son chromosome 1, cette bactérie possède également un effecteur orphelin au niveau de son chromosome 2, qui impliqué dans l'altération de la physiologie des macrophages (Aubert et al., 2016). Cet effecteur, TecA, est une désaminase entraînant l'inactivation des GTPases et par conséquent la perturbation du cytosquelette d'actine des cellules de l'hôte (Aubert et al., 2016).

e. Effecteurs interrègne

Les premiers effecteurs décrits comme ayant une activité anti-procaryote et comme pouvant cibler directement les cellules eucaryotes sont des phospholipase D (PldA/PldB) associées aux H2(i1)/3(i4b)-T6SS de *P. aeruginosa* (Jiang et al., 2014). Ces phospholipases ont une activité antibactérienne (Jiang et al., 2014; Russell et al., 2013) mais peuvent également activer une voie de signalisation entraînant le réarrangement du cytosquelette d'actine des cellules hôtes et par conséquent l'internalisation des bactéries (Jiang et al., 2014). Cette internalisation fait également intervenir VgrG2b, sécrété par le H2-T6SS (i1) de *P. aeruginosa* (Sana et al., 2015). VgrG2b est un VgrG spécialisé orphelin conservé au sein de l'espèce *P. aeruginosa*. Il contient un domaine d'interaction avec les complexes de tubuline alpha, bêta et gamma et participe à l'internalisation des bactéries dans les cellules hôtes (Sana et al., 2015). En plus de son activité anti-eucaryote, VgrG2b peut également être toxique envers les cellules bactériennes (Berni et al., 2019).

Chez *Vibrio cholerae*, le T6SS est associé aux effecteurs TseL (Tle) et VasX (Tme) aux propriétés antibactériennes (Dong et al., 2013). Ces deux effecteurs, ainsi que VgrG1 (contenant un domaine de réticulation de l'actine) sont nécessaires à la virulence de *V. cholerae* envers l'amibe *Dictyostelium discoideum* et ont aussi une activité nématocide (Dong et al., 2013; Pukatzki et al., 2006).

Klebsiella pneumoniae possède un VgrG-4 ayant une activité antimicrobienne envers diverses espèces bactériennes (*K. pneumoniae* ATCC43816, *A. baumannii* ATCC17978 et *B. cenocepacia* K56-2) et fongiques (*Candida albicans* et *Saccharomyces cerevisiae*). Cette activité est due au domaine DUF2345 de VgrG-4 qui entraîne la production d'espèces réactives de l'oxygène (ROS) et par conséquent un stress oxydatif chez les bactéries (Storey et al., 2020). VgrG-4 perturbe les cellules eucaryotes en ciblant les mitochondries (Sá-Pessoa et al., 2023). Il provoque le transfert de calcium (Ca^{2+}) du réticulum endoplasmique vers les mitochondries, ce qui active une protéine entraînant la fragmentation des mitochondries. L'augmentation de la concentration de Ca^{2+} active également un récepteur immunitaire appelé NLRX1, qui produit des ROS mitochondriaux. Cette production de ROS limite alors la réponse inflammatoire de la cellule cible. *K. pneumoniae* utilise ainsi son T6SS pour échapper au système immunitaire de son hôte (Sá-Pessoa et al., 2023). Cette étude est la première à décrire l'activité d'un effecteur ciblant les mitochondries.

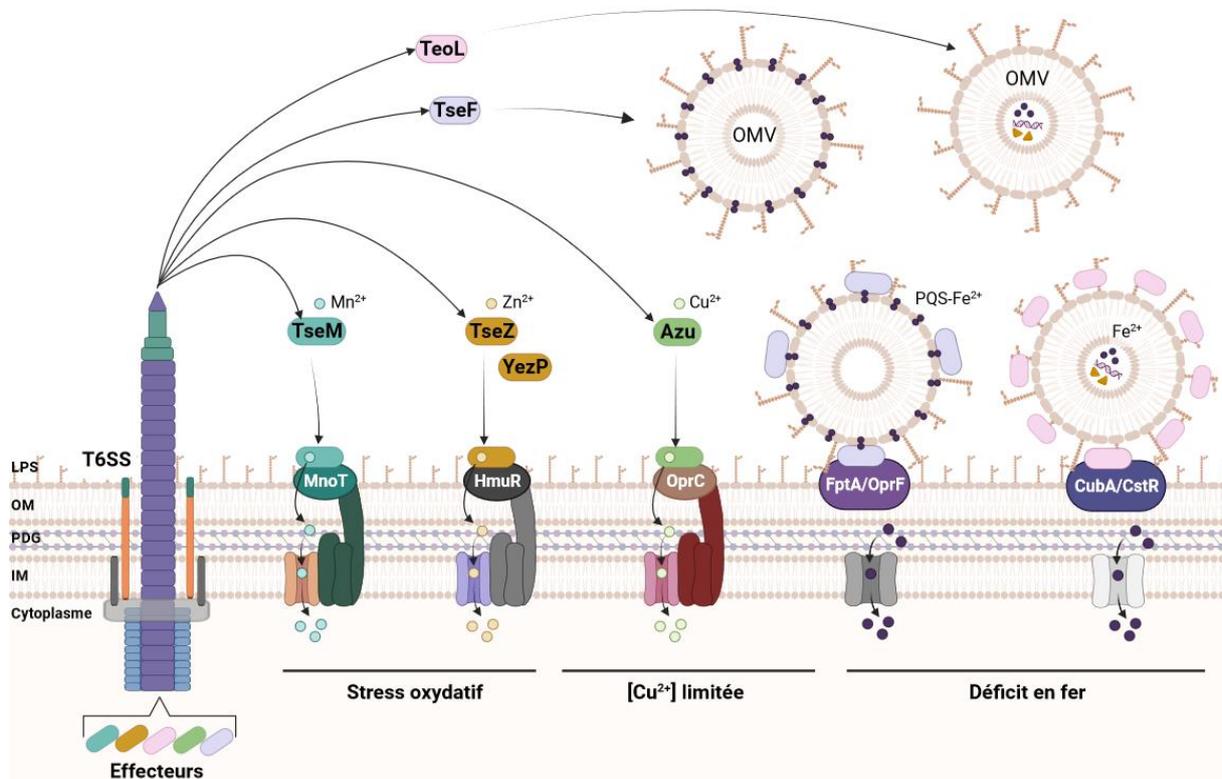


Figure 22. Représentation schématique du captage des ions métalliques médié par le T6SS. Chez *Burkholderia thailandensis*, les effecteurs TseM et TseZ sont sécrétés par le T6SS en condition de stress oxydatif. Ces effecteurs se fixent respectivement aux ions manganèse (Mn^{2+}) et zinc (Zn^{2+}) avant d'interagir avec des récepteurs membranaires permettant la translocation des ions métalliques dans le cytoplasme des cellules productrices. De la même manière, *Yersinia pseudotuberculosis* sécrète l'effecteur YezP impliqué dans l'acquisition du zinc en condition de stress oxydatif. En condition de concentration en cuivre (Cu^{2+}) limitée, *P. aeruginosa* sécrète l'effecteur Azu ayant une forte affinité pour le Cu^{2+} grâce à son H2-T6SS. Azu- Cu^{2+} interagit alors avec le récepteur de surface OprC, permettant le transport du Cu^{2+} dans les cellules productrices. *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 sécrète l'effecteur TseF grâce au H3-T6SS en condition de déficit en fer (Fe^{2+}). TseF est impliqué dans l'acquisition du fer en se fixant aux complexes PQS- Fe^{2+} présents au niveau des vésicules de la membrane externe (OMV). Les PQS (Pseudomonas Quinolone Signal) sont des molécules de signalisation ayant une forte affinité pour le fer. La reconnaissance de TseF par le récepteur de surface FptA ou OrpF facilite alors le transport du fer au niveau du cytoplasme des cellules productrices. L'effecteur TeoL sécrété par le T6SS de *Cupriavidus necator* joue un rôle similaire en condition de déficit en fer. TeoL se fixe aux LPS (lipopolysaccharides) présents à la surface des OMV et aux récepteurs de surface CubA et CstR, permettant le transport du fer présent dans les OMV au niveau du cytoplasme des cellules productrices. D'après Li et al., 2022; Lin et al., 2021; H., Liu et al., 2023.

f. Effecteurs impliqués dans l'acquisition des ressources

Certains effecteurs sont sécrétés dans l'environnement extracellulaire, où ils exercent un rôle de chélateur d'ions métalliques (manganèse, zinc et cuivre) ou recrutent des vésicules de la membrane externe (OMV) (Figure 22).

Le rôle du T6SS dans l'acquisition d'ions métalliques a été démontré chez *P. taiwanensis* (Chen et al., 2016). Cette bactérie sécrète un chélateur de fer, la pyoverdine, dont la sécrétion dans l'environnement extracellulaire est dépendante d'un T6SS fonctionnel (Chen et al., 2016). Chez *B. thailandensis*, le T6SS-4 est impliqué dans l'acquisition du manganèse et du zinc grâce à l'activité respective des effecteurs TseM et TseZ. Régulé par le régulateur du stress oxydatif OxyR et le régulateur de l'absorption du zinc Zur, le T6SS-4 joue un rôle dans la résistance au stress oxydatif, la compétition d'exploitation et la virulence de *B. thailandensis* (Si et al., 2017a; Si et al., 2017b). L'effecteur YzeP de *Yersinia pseudotuberculosis* est impliqué dans l'absorption du zinc (Zn^{2+}) en condition de stress oxydatif (M., Liu et al., 2023). YezP est sécrété dans le milieu extracellulaire où il se lie au Zn^{2+} . Le complexe YezP- Zn^{2+} interagit alors avec un transporteur membranaire HmuR permettant le transport du Zn^{2+} dans le périplasme où il se lie à un nouveau chélateur d'ion métallique, ZnuA. ZnuA- Zn^{2+} interagit à son tour avec un transporteur de la membrane interne ZnuCB, permettant le transport du Zn^{2+} dans le cytoplasme (M., Liu et al., 2023). Chez *P. aeruginosa*, le H2-T6SS sécrète l'effecteur de liaison au cuivre, Azu (Azurin), en condition de faibles concentrations en cuivre. Azu capte le cuivre dans le milieu extérieur et se lie au récepteur de la membrane externe OrpC (Han et al., 2019). Son activité confère un avantage compétitif à *P. aeruginosa* contre *E. coli* en condition de faibles concentrations en cuivre et participe à la virulence de *P. aeruginosa* envers la souris (Han et al., 2019).

Certains effecteurs sécrétés par les T6SS peuvent être impliqués dans l'acquisition d'ions métalliques en interagissant avec les OMV. Par exemple, l'effecteur TseF, associé au H3-T6SS de *P. aeruginosa* PAO1, contribue de manière significative à l'acquisition du fer en interagissant avec les sidérophores présents dans les OMV (Lin et al., 2017). Cette interaction favorise le recrutement des OMV au niveau de la membrane externe où TseF interagit directement avec des récepteurs de sidérophores (Lin et al., 2017). L'effecteur TeoL, sécrété par le T6SS de *Cupriavidus necator*, joue un rôle similaire dans la compétition pour le fer (Li et al., 2022). TeoL interagit avec les phospholipides des OMV, facilitant ensuite leur recrutement vers deux

Tableau 2. Toxines et effecteurs associés aux H1, H2 et H3-T6SS de *Pseudomonas aeruginosa*. Les nombres de toxines et effecteurs associés aux T6SS sont variables. Les T6SS peuvent sécréter des effecteurs ayant des rôles très distincts et pouvant cibler des types cellulaires différents. Par exemple, le H2-T6SS de *P. aeruginosa* sécrète des effecteurs ciblant d'autres bactéries, des effecteurs ciblant les cellules eucaryotes et des effecteurs sécrétés dans l'environnement extérieur et impliqués dans la compétition pour les ressources. *Effecteurs non conservés chez *P. aeruginosa* PAO1. Tableau tiré des travaux de Rudzite et al., (2023).

	Effector	Cognate toxin immunity	Description	
H1-T6SS	Tse1 (PA1844)	Tsi1 (PA1845)	Amidase that hydrolyses peptidoglycan crosslinks causing target cell lysis	
	Tse2 (PA2702)	Tsi2 (PA2703)	NAD dependent ADP-ribosyltransferase that causes quiescence, toxic when expressed in eukaryotic cells	
	Tse3 (PA3484)	Tsi3 (PA3485)	Muramidase that hydrolyses peptidoglycan backbone causing target cell lysis	
	Tse4 (PA2774)	Tsi4 (PA2775)	Forms ion selective membrane pores that disrupt proton motive force	
	Tse5 /RhsP1 (PA2684)	Tsi5 /RhsP1i (PA2683.1)	Forms ion selective membrane pores resulting in loss of membrane potential, contains RHS and PAAR domains	
	Tse6 (PA0093)	Tsi6 (PA0094)	NAD(P)+ glycohydrolase that depletes NAD(P)+ resulting in target bacteriostasis, contains PAAR domain	
	Tse6 ^{PA14} /Tas1 (PA14_01140)*	Tsi1 (PA14_01130)*	(p)ppApp synthetase that rapidly depletes prey ATP/ADP pool, contains RHS and PAAR domains	
	Tse7 (PA0099)	Tsi7 (PA0100)	Tox-GHH2 nuclease, contains PAAR domain	
	Tse8 (PA4163)	Tsi8 (PA4164)	Targets transamidosome complex disrupting protein synthesis	
H2-T6SS	Tle1 (PA3290)	Tli1a (PA3291) Tli1b (PA3292)	Phospholipase A2 activity	
	Tle2 (PAK_03765)*	Tli2a (PAK_03766)* Tli2b (PAK_03767)*	Phospholipase A1 activity	
	Tle3 (PA0260)	Tli3 (PA0259)	Phospholipase	
	Tle4 /TplE (PA1510)	Tli4 /TplEi (PA1509)	Phospholipase, contains PGAP1-like domain to aid internalisation into host cells and localisation at ER membrane inducing autophagy, both antibacterial and anti-host toxicity	
	PldA /Tle5a (PA3487)	Tli5a (PA3488)	Phospholipase D with preference for PE (phosphatidylethanolamine) as substrate, activate PI3K/Akt pathway that promotes internalisation into host cells, both antibacterial and anti-host toxicity	
	PldB /Tle5b (PA5089)	Tli5b ₁ (PA5088) Tli5b ₂ (PA5087) Tli5b ₃ (PA5086)	Phospholipase D, activates PI3K/Akt Pathway that promotes internalisation into host cells, both antibacterial and anti-host toxicity	
	VgrG2b (PA0262)	VgrG2bi (PA0261)	Contains zinc- metallopeptidase domain, hydrolyses peptidoglycan in cell division plane causing target lysis. Interacts with α - and β -tubulins and γ TuRC promoting internalisation into nonphagocytic cells, both antibacterial and anti-host toxicity	
	AmpDh3 (PA0807)	AmpDh3i (PA0808)	Cell wall remodelling amidase that contributes to β -lactam resistance, hydrolyses target cell peptidoglycan cross links	
	TseT (PA3907)	TsiT (PA3908)	TOX-REase domain containing nuclease	
	TseV (PA0822)	TseV (PA0821)	Putative VRR-NUC domain containing nuclease	
	PA5265	PA5264	Contains MIX (marker for type six effectors) motif	
	RhsP2 (PA14_43100)*	RhsP2i (PA14_43090)*	ADP-rebosyltransferase that targets cells ncRNA pool causing growth arrest, contains RHS domain	
	PA2066	Unknown	Putative Hcp2 associated effector	
	Azu (PA4922)	-	Common good effector, copper binding and uptake	
	ModA (PA1863)	-	Common good effector, molybdite binding and uptake	
	H3-T6SS	PA0256	Unknown	Putative Hcp3 associated effector
		TseF (PA2374)	-	Common good effector, interacts with PQS and the siderophore receptor FptA aiding in iron uptake
TepB (PA14_33970)*		-	Common good effector associated with improved abiotic stress tolerance under biofilm condition, translocated to host cells	

récepteurs membranaires. Le recrutement des OMV par TeoL contribue de manière significative à la compétition d'exploitation pour le fer chez *Cupriavidus necator*. TeoL est également capable d'interagir avec les OMV produites par d'autres espèces bactériennes, telles que *P. aeruginosa* et *Yersinia pseudotuberculosis* (Li et al., 2022).

Lorsque les effecteurs T6SS captent les ions métalliques dans le milieu extérieur, ils deviennent des biens publics et peuvent donc être récupérés par des tricheurs qui ont des récepteurs homologues à ceux nécessaires pour leur recapture. Pour éviter cela, certaines bactéries sécrètent des effecteurs ayant une double fonction : captation du fer et activité toxique. C'est le cas de l'effecteur TepC, sécrété par le T6SS de *Y. pseudotuberculosis*, qui a une capacité de liaison au fer (Fe^{3+}) et possède une activité DNase aux propriétés antibactériennes. Lorsque TepC est sécrété dans le milieu extérieur et qu'il se lie au fer, TepC- Fe^{3+} devient un bien public et les bactéries possédant un récepteur de type TdsR peuvent alors capturer le complexe TepC- Fe^{3+} . Les tricheurs qui possèdent les récepteurs adaptés mais qui ne produisent pas TepC, et par conséquent la protéine d'immunité TipC, se trouvent alors confrontés à l'activité DNase de TepC. Ainsi, la dualité de fonction de l'effecteur TepC permet aux bactéries productrices de capter les ressources en fer du milieu extérieur tout en limitant le potentiel des tricheurs (Filloux, 2024; Song et al., 2024).

g. Distribution des effecteurs et avantages de la diversité

Distribution des effecteurs

Le nombre d'effecteurs associés à chaque T6SS est très variable. Par exemple, le T6SS Sci1 (i2) d'*E. coli* S17.2 est associé à un effecteur unique de type lipase (Flaumnatti et al., 2016). Chez *P. aeruginosa* PAO1, 9, 15 et 3 effecteurs ont été décrits comme étant associés respectivement au H1, H2 et H3-T6SS (**Tableau 2** ; Rudzite et al., 2023). Différentes classes d'effecteurs peuvent être sécrétées par le même T6SS. Par exemple, le H2-T6SS de *P. aeruginosa* PAO1 est associé à des effecteurs ayant des activités très diverses et pouvant cibler des cellules procaryotes, des cellules eucaryotes ou encore jouer un rôle dans l'acquisition d'ions métalliques (**Tableau 2**). Toutes les souches d'une même espèce et possédant les mêmes T6SS ne partagent pas forcément le même set d'effecteurs. Chez *P. aeruginosa* 14 effecteurs sont conservés entre 52 souches alors que de nombreux autres sont distribués aléatoirement au sein d'une ou plusieurs

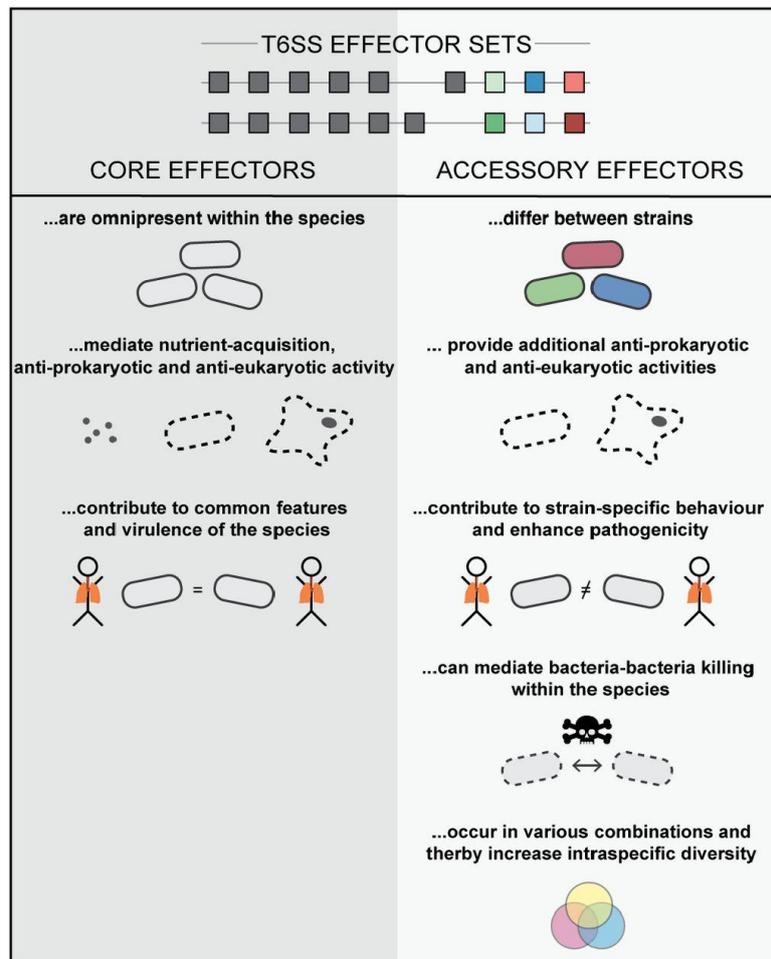


Figure 23. Effecteurs core et effecteurs accessoires associés aux T6SS de *P. aeruginosa*. Les effecteurs core partagés entre toutes les souches de l'espèce *P. aeruginosa* contribuent à la virulence et aux comportements communs de ces souches. *A contrario*, les effecteurs accessoires sont souche-spécifiques et participent à la diversité intraspécifique. Ils peuvent conférer des activités anti-procaryotes ou anti-eucaryotes additionnelles et ainsi améliorer la virulence des bactéries ou être impliqués dans la compétition intraspécifique (Habich et al., 2022).

souches (**Figure 23.**; Habich et al., 2022). Les associations entre les effecteurs core et les effecteurs accessoires ne sont pas aléatoires et donnent lieu à 36 sets d'effecteurs différents plus ou moins distribués au sein de l'espèce *P. aeruginosa* (Habich et al., 2022). Les effecteurs core seraient essentiels à la virulence de *P. aeruginosa* alors que les effecteurs accessoires pourraient procurer des activités anti-procaryotes et anti-eucaryotes additionnelles (Habich et al., 2022).

Avantages de la diversité

Avoir une grande diversité d'effecteurs peut être avantageux pour les bactéries car les effecteurs ont une toxicité variable en fonction de leurs activités et de la dose injectée (Rudzite et al., 2023). De plus, les effecteurs peuvent agir en synergie afin d'améliorer leurs activités respectives (LaCourse et al., 2018; Rudzite et al., 2023). Par exemple, chez *P. aeruginosa* PAO1, deux couples d'effecteurs agissent en synergie : Tse1 (Tae) / Tse4 (Tme) et Tse4 (Tme) / Tse6 (Tne) (LaCourse et al., 2018). En dégradant le peptidoglycane, Tse1 permettrait à Tse4 d'accéder à la membrane interne afin d'y former des pores. La synergie entre ces effecteurs perturberait la force proton-motrice de la membrane bactérienne, amplifiant ainsi l'inactivation des transporteurs d'ions (NAD(P)+) par Tse6 (LaCourse et al., 2018).

Les paramètres environnementaux peuvent impacter l'activité des effecteurs (LaCourse et al., 2018; Le et al., 2021). Par exemple, la synergie entre Tse1 et Tse4 est plus efficace en condition de forte salinité (LaCourse et al., 2018). Chez *Acinetobacter baumannii*, les activités transglycosylase et endopetidase de l'effecteur Tse4 (Tae) sont augmentées en condition de pH basique (Le et al., 2021). Ainsi, posséder des effecteurs ayant des activités qui répondent différemment aux paramètres environnementaux peut être avantageux pour les bactéries.

Finalement, comme nous le verrons dans la partie III.5, les cellules cibles peuvent mettre en place différents mécanismes de défense pour se protéger d'une attaque par le T6SS. En revanche, posséder les protéines d'immunité associées aux différents types d'effecteur reste la défense la plus efficace. Ainsi, avoir une grande diversité d'effecteurs pourrait permettre à la souche productrice d'augmenter ses chances de tuer les cellules cibles, tout en renforçant sa capacité à résister à l'attaque d'autres bactéries productrices de T6SS.

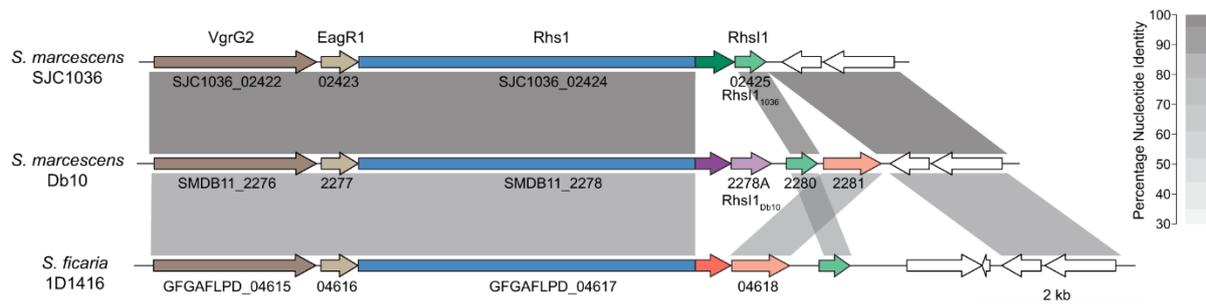


Figure 24. Graphique de synténie comparant des groupes de gènes T6SS de *S. marcescens* SJC1036, *S. marcescens* Db10 et *S. ficaria* 1D1416. Les ombres indiquent les pourcentages d'identité nucléotidique par paire comme indiqué par la clé à droite. Les couleurs indiquent les gènes codant pour des protéines homologues. Chaque souche possède un effecteur PAAR-Rhs-CT (en bleu) dont les domaines toxiques NADase ne sont pas homologues. Ils nécessitent donc la présence de protéines d'immunité qui leur sont spécifiques (vert, violet et orange). Les souches peuvent posséder les protéines d'immunité associés à l'effecteur d'une autre souche, codé en aval de son cluster VgrG-EagR-Rhs-RhsI. D'après Hagan et al. (2023).

5. Défenses face aux effecteurs du T6SS

a. Protéines d'immunité orphelines

Des études récentes sur divers taxons bactériens ont mis en évidence des clusters de gènes d'immunité orphelins acquis par transfert horizontal de gènes. Les protéines d'immunité orphelines peuvent être codées proches des autres gènes du T6SS ou de manière indépendante. La présence de gènes d'immunité orphelins a tout d'abord été mise en évidence chez *V. cholerae* et d'autres espèces de *Vibrio* étroitement apparentées (Kirchberger et al., 2017).

Les protéines d'immunité orphelines peuvent également être regroupées en îlots de gènes d'immunité qui protègent de manière cumulative contre plusieurs effecteurs. Ces îlots peuvent être génétiquement liés à des recombinaisons ou être incorporés dans des éléments génétiques mobiles. C'est notamment le cas chez plusieurs espèces du genre *Bacteroides* (Ross et al., 2019). Un îlot de 8 gènes d'immunité a également été détecté chez *Salmonella* Typhi (Barretto and Fowler, 2020).

Des gènes codant des protéines d'immunité orphelines peuvent également être présents à l'intérieur des clusters T6SS comme décrit chez *S. marcescens* SJC1036, *S. marcescens* Db10 et *S. ficaria* 1D1416 (Hagan et al., 2023). Ces bactéries possèdent des effecteurs de type Rhs-NADase qui nécessitent leurs protéines d'immunité respectives pour être inactivés (Hagan et al., 2023). En aval des gènes codant les protéines d'immunité des effecteurs associés, les bactéries peuvent également posséder des gènes conférant l'immunité à des effecteurs sécrétés par d'autres souches. Par exemple, *S. ficaria* 1D1416 possède un gène homologue au gène d'immunité de *S. marcescens* SJC1036. La protéine homologue à Rhs1¹⁰³⁶ présente chez Db10 protège efficacement *S. marcescens* Db10 de la NADase de *S. marcescens* SJC1036 (**Figure 24**; Hagan et al., 2023).

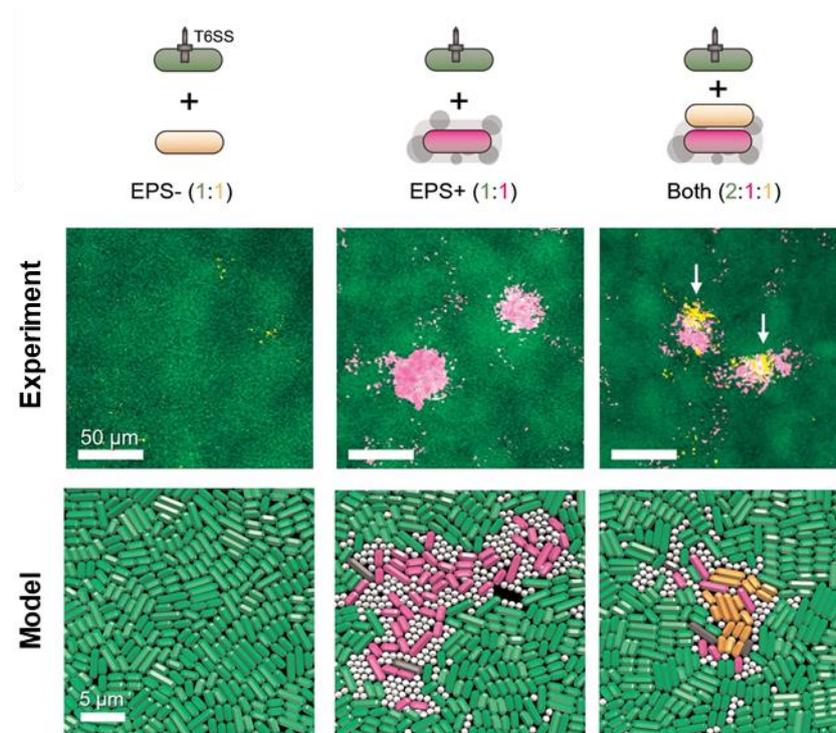


Figure 25. La production d'exopolysaccharides (EPS) comme mécanisme de défense individuel et collectif. En haut, images de microscopie confocale montrant l'assemblage des communautés après 6h de confrontation entre *A. baylyi* T6SS+ (vert), *E. coli* EPS+ (rose) et *E. coli* EPS- (jaune). En bas, résultat d'un modèle informatique correspondant aux scénarii expérimentaux utilisés pour obtenir les images de microscopie. L'absence de production d'EPS (scénario *A. baylyi* vs. *E. coli* EPS-) entraîne la disparition des cellules proies (*E. coli* EPS-) après 6h de confrontation. La production d'EPS (scénario *A. baylyi* vs. *E. coli* EPS+) permet de limiter le contact entre les cellules proies et les cellules attaquantes, permettant à une sous-population de *E. coli* EPS+ de survivre après 6h de confrontation. La production d'EPS permet également de protéger des cellules EPS- de l'attaque par T6SS (scénario *A. baylyi* vs. *E. coli* EPS+ et *E. coli* EPS-). D'après Granato et al., 2023.

b. Barrières physiques

Parois bactériennes

En tant que constituant essentiel des parois bactériennes, le peptidoglycane est la cible de nombreux effecteurs du T6SS. Les bactéries Gram-négatives possèdent une couche de PDG moins dense que les Gram-positives ce qui les rend plus sensibles aux effecteurs ciblant le PDG. Afin de limiter l'action des amidases (L,D-endopeptidase) et muramidases sécrétées par *P. aeruginosa* PAO1, certaines bactéries comme *A. baumannii* modifient la structure de leur PDG en substituant les L-Lysine en D-Lysine (Le et al., 2020).

Exopolysaccharides

Les exopolysaccharides (EPS) sont de longues chaînes de glucides produites par certaines bactéries qui peuvent être, ou non, relâchées dans leur environnement extracellulaire. Ces composés revêtent une importance cruciale en formant une matrice de protection autour des cellules bactériennes. Par exemple, chez *V. cholerae*, les EPS agissent comme une armure défensive contre les attaques du T6SS de *P. aeruginosa* PAO1 (Toska et al., 2018). L'effet protecteur des EPS n'entrave pas la fonctionnalité des T6SS endogènes, ce qui suggère que la structure des EPS module le passage et permet la sortie des T6SS mais pas l'entrée des T6SS étrangers (Toska et al., 2018). Ce moyen de défense est également employé par *B. subtilis* 3610 qui produit une matrice EPS le protégeant des attaques par *P. fluorescens* PCL1606 (Molina-Santiago et al., 2019). En l'absence de cette matrice, *P. fluorescens* est capable d'envahir les populations de *B. subtilis*, ce qui a pour conséquence d'augmenter le taux de sporulation de *B. subtilis* qui utilise cet autre mécanisme de survie comme moyen de défense face au T6SS. Le même phénotype est observé *in planta*. La production de matrice EPS par *B. subtilis* permet ainsi la coexistence des deux souches sur les feuilles de melon et les graines en germination (Molina-Santiago et al., 2019). Par des approches de modélisations informatiques et de microscopies, Granato et al. (2023) ont montré que les EPS diffus peuvent agir comme un mécanisme de défense collective. Les *E. coli* productrices d'EPS peuvent en effet protéger des *E. coli* non productrices face à l'attaque T6SS d'*A. baylyi* (**Figure 25** ; Granato et al., 2023). Des souches résistantes au T6SS ont donc la capacité de former des barrières protectrices afin de préserver les souches sensibles des attaques du T6SS.

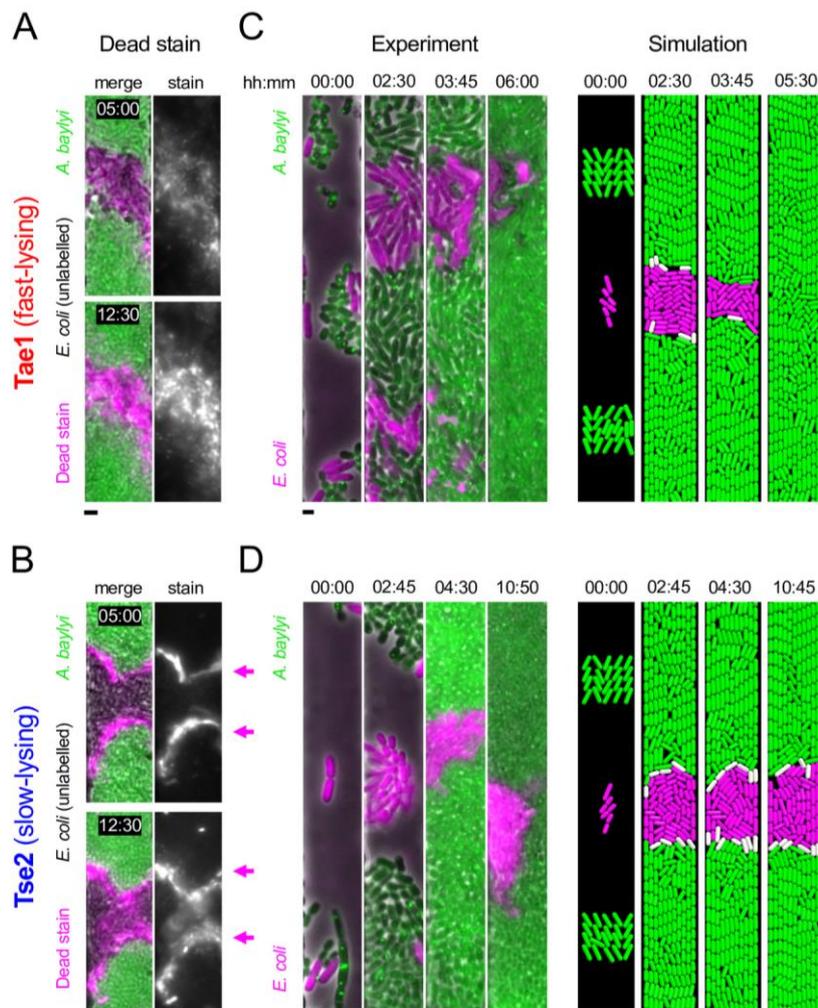


Figure 26. La présence de barrières de cellules mortes comme moyen de défense face au T6SS. Résultats de confrontation entre *A. baylyi* (T6SS+) et *E. coli* (T6SS-) en faisant varier le type d'effecteur T6SS sécrété : effecteur lytique Tae (A, C) ou effecteur non lytique Tse2 (B, D). (A, B) Images de microscopie à fluorescence des cellules mortes (« Dead strain ») montrant les cellules d'*E. coli* tuées (rose) par *A. baylyi* (vert). (C, D) Images de microscopie en time-lapse (« Experiment » à gauche) montrant la dynamique de compétition entre *A. baylyi* (vert) et *E. coli* (rose). Résultats des simulations (« Simulation » à droite) faites à l'aide d'un modèle informatique utilisant les mêmes scénarii que ceux testés expérimentalement avec les cellules attaquantes (vert), les cellules cibles (rose) et les cellules cibles mortes (blanc). Lorsque les cellules cibles sont attaquées par un compétiteur T6SS+, les cellules mortes forment une barrière protectrice limitant le contact entre les cellules attaquantes et les cellules cibles encore vivantes. La défense conférée par cette barrière peut être contournée si les effecteurs sécrétés entraînent une lyse rapide des cellules cibles (panel du haut). En revanche, si l'effecteur n'entraîne pas de lyse des cellules mortes (panel du bas), la barrière persiste plus longtemps permettant aux cellules cibles de survivre en formant des micro-colonies au sein de la communauté. D'après les travaux de Smith et al., 2020b.

c. Séparation spatiale

Barrière de cellules mortes

Lorsque les bactéries cibles sont attaquées par une population de bactéries T6SS+, leurs cadavres peuvent créer une barrière de défense permettant de protéger les cellules cibles encore vivantes (**Figure 26**). Par exemple, *Vibrio cholerae* C6706 est une bactérie qui exprime son T6SS de manière constitutive. Initialement très agressive envers les cellules cibles, sa capacité d'attaque diminue au bout de 3h de confrontation sur milieu solide (Steinbach et al., 2020). Cette diminution est due à l'apparition de barrières de cellules mortes qui protègent les cellules cibles des attaques de *V. cholerae* C6706. Ces barrières permettent de maintenir des micro-colonies de cellules cibles intactes pendant des heures, même si elles sont attaquées à hauteur de 99% (Steinbach et al., 2020). Cette défense peut toutefois être contournée par les bactéries T6SS+ si celles-ci sécrètent des effecteurs lytiques entraînant une lyse rapide des cellules cibles (**Figure 26** ; Smith et al., 2020).

Taux de croissance

Le taux de croissance des bactéries peut impacter leur résistance ou leur sensibilité aux effecteurs du T6SS. Chez *Myxococcus xanthus*, une diminution du taux de croissance entraîne une sensibilité des bactéries à l'effecteur TseX, même si les bactéries produisent la protéine d'immunité TsiX (Troselj et al., 2018). Le T6SS peut ainsi être utilisé par les bactéries pour éliminer les cellules moins aptes, facilitant ainsi l'atteinte de l'homéostasie au sein d'une population et la synchronisation des comportements (Troselj et al., 2018). Un autre exemple concerne *V. cholerae* O37 V52 qui est sensible à son propre T6SS lorsqu'elle est en phase stationnaire et que les cellules attaquantes sont en phase exponentielle de croissance (Hersch et al., 2020b). Cette bactérie produit un effecteur de type peptidoglycane hydrolase (TseH) et la production de la protéine d'immunité associée (TsiH) n'est pas suffisante pour résister à l'activité de cet effecteur. La bactérie met donc en place d'autres mécanismes de défense impliquant notamment la production d'EPS. Cependant, la synthèse d'EPS est très coûteuse en énergie et sa production peut être limitée en milieu appauvri en nutriment (Hersch et al., 2020b).

d. Réponses aux stress

De nombreux effecteurs du T6SS ciblent les membranes et les parois bactériennes. Pour se défendre face à ces effecteurs lytiques, les bactéries peuvent mettre en place des réponses aux stress de l'enveloppe ou ESR (Cho et al., 2023; Hersch et al., 2020a). Par exemple, l'immunité complète de *V. cholerae* O37 V52 face à son effecteur TseH fait intervenir un système à deux composants (WigKR) impliqué dans les réparations des dommages au peptidoglycane (Hersch et al., 2020b). Ce système régule positivement la formation de biofilm et la production d'EPS qui participent aux défenses de la bactérie (Hersch et al., 2020b). *Escherichia coli* met également en place des ESR qui lui permettent de résister à l'effecteur TseH sécrété par *V. cholerae*. Cette résistance fait intervenir deux systèmes ESR : la réponse Rcs et le système à deux composants BaeSR (Hersch et al., 2020b). La réponse Rcs fait intervenir le régulateur transcriptionnel RcsB qui régule positivement des gènes de réponse au stress osmotique (une des conséquences des dommages causés au PDG) et des gènes de synthèse d'EPS (Hersch et al., 2020b). La production d'EPS permet de renforcer la paroi bactérienne et donc de limiter l'impact des enzymes lytiques ciblant les parois cellulaires.

Une autre forme de réponse aux stress de l'enveloppe peut impliquer l'activation de la sporulation comme observée chez *B. subtilis* en réponse aux dommages au PDG causés par la muramidase Tse1 de *P. chlororaphis* (Pérez-Lorente et al., 2023).

Les réponses aux stress peuvent également faire intervenir des mécanismes de réparation de l'ADN permettant aux bactéries de se défendre face aux effecteurs ciblant les acides nucléiques. Par exemple, la DNase Tse7, sécrétée par le H1-T6SS de *P. aeruginosa* PAO1, induit le système SOS de réparation de l'ADN chez *E. coli* (Pissaridou et al., 2018).

e. Attaquer pour mieux se défendre

Les bactéries utilisent différentes stratégies pour déployer leur T6SS. Certaines, comme *V. cholerae*, utilisent leur T6SS de manière offensive en exprimant en permanence leurs gènes T6SS et en assemblant et en déclenchant leur système de manière aléatoire. D'autres utilisent leur T6SS de manière défensive en réponse à une attaque extérieure. Cette stratégie est connue sous le terme « tit-for-tat » que l'on peut traduire par « œil pour œil, dent pour dent ». *P. aeruginosa* PAO1 utilise cette stratégie et déclenche son H1-T6SS en réponse à des

dommages membranaires ou la détection de la lyse de ses cellules clonales (Basler et al., 2013; LeRoux et al., 2015; Stolle et al., 2021). Le déclenchement de son T6SS fait intervenir les protéines accessoires TagQRST-PpkA-PppA-Fha1 (cf. III.2.a). Cette stratégie permet à *P. aeruginosa* de contrattaquer en activant ses T6SS au point de contact avec les cellules attaquantes (Basler et al., 2013; Basler and Mekalanos, 2012). *Klebsiella pneumoniae* active également son T6SS en réponse à des attaques par le T6SS (Storey et al., 2020). Cette régulation du T6SS fait intervenir le système à deux composants PhoPQ impliqué dans la réponse aux stress de l'enveloppe. Contrairement à *P. aeruginosa*, la régulation du T6SS de *K. pneumoniae* en réponse à des attaques extérieures se fait au niveau transcriptionnel (Storey et al., 2020).

Utiliser la stratégie tit-for-tat peut être plus ou moins avantageux pour les bactéries. En confrontation avec des souches dépourvues de T6SS, les bactéries TFT peuvent perdre l'avantage car leur T6SS n'est pas activé (Smith et al., 2020a). En revanche, face à des compétiteurs utilisant leur T6SS aléatoirement, la stratégie TFT peut s'avérer avantageuse. En effet, en plaçant des T6SS sur les sites d'attaque, les bactéries peuvent améliorer considérablement l'efficacité de leurs frappes par rapport à des tireurs aléatoires qui n'ont aucune information sur l'emplacement de leurs cibles (Smith et al., 2020a).

f. Interférence dans la régulation

L'une des stratégies de défense adoptées par les cellules cibles consiste à perturber la régulation des T6SS des bactéries attaquantes. *Vibrio fischeri* FQ-A001, un symbionte du calmar, utilise son T6SS pour coloniser les cryptes de l'organe lumineux de son hôte en empêchant la colonisation par d'autres souches de *V. fischeri* (Guckes et al., 2023; Sun et al., 2016). Le T6SS de *V. fischeri* FQ-A001 est régulé négativement par le quorum sensing *via* la molécule C8-HSL. Ainsi des souches de *V. fischeri* produisant cette molécule de signalisation peuvent inhiber le T6SS de de FQ-A001, favorisant ainsi la diversité infraspécifique au sein de la même crypte (Guckes et al., 2023).

6. Régulation du T6SS

Le fonctionnement du T6SS est régulé par divers facteurs biotiques et abiotiques à différents niveaux : transcriptionnel, post-transcriptionnel et post-traductionnel (Bernal et al., 2020; Hespanhol et al., 2023). Certaines bactéries possèdent plusieurs T6SS qui peuvent être sujets à différents mécanismes de régulation. Ces mécanismes de régulation peuvent avoir des actions combinatoires et synergiques, ce qui fait du T6SS un système de sécrétion très finement régulé. Dans cette partie, nous donnerons un aperçu des facteurs et mécanismes impliqués dans la régulation des T6SS.

a. Facteurs abiotiques

Le T6SS peut être régulé par divers paramètres environnementaux. Par exemple, chez le phytopathogène *A. tumefaciens*, le T6SS est activé en milieu acide (pH 5,5), condition environnementale retrouvée sur les feuilles blessées ou les apoplastes (Wu et al., 2012). La présence d'extrait de plante dans le milieu du phytopathogène *P. astrosepticum* induit la production des composants Hcp et VgrG (Mattinen et al., 2008). Chez *V. fischeri*, symbionte du calmar, un pH et une viscosité similaire à celle de l'hôte régule positivement la production de T6SS (Speare et al., 2021). Pour la souche *Vibrio cholerae* O1, la présence de chitine (composant structural de la paroi cellulaire de nombreux animaux) et des paramètres similaires à l'environnement aquatique dans lequel elle vit (température faible et forte osmolarité) régule positivement l'activité du T6SS (Chourashi et al., 2018; Ishikawa et al., 2012).

Chez *Edwardsiella tarda*, un agent pathogène opportuniste de différentes espèces de poisson, le T6SS est positivement régulé par des températures et des concentrations en magnésium proches de celles retrouvées chez ses hôtes (Chakraborty et al., 2010). La concentration en fer peut également impacter la régulation des T6SS. C'est par exemple le cas chez *Salmonella enterica* (S., Wang et al., 2019) et *C. necator* (Li et al., 2022) où une forte concentration en fer réprime l'expression de gènes du T6SS. Ce mécanisme de régulation par le fer est à relier aux compétitions trophiques pour les ressources en fer.

b. Facteurs biotiques

Contrôle par retour d'information

Chez *V. cholerae*, le T6SS est régulé par la quantité de ses composants sécrétés. L'accumulation de la protéine Hcp dans les cellules permet aux bactéries de rapidement ajuster l'expression de leur T6SS afin d'éviter l'accumulation inutile de ses composants lorsque le T6SS est inactif. Cette régulation est une stratégie d'économie d'énergie importante qui peut être observée dans différentes souches bactériennes comme *Aeromonas dhakensis* et *P. aeruginosa* (Manera et al., 2021).

Quorum sensing (QS)

Le quorum sensing est un mécanisme de régulation de l'expression des gènes en réponse à des changements de densité de population (Miller and Bassler, 2001). Dans le cadre du QS, les bactéries produisent des molécules de signalisation. Lorsque la population bactérienne atteint une densité suffisamment élevée, la concentration de ces molécules de signalisation dans l'environnement devient suffisamment importante pour déclencher des réponses cellulaires spécifiques. Chez *Chromobacterium violaceum*, le QS régule positivement l'expression du T6SS entraînant une activité plus importante du T6SS lorsque que la densité de population est élevée (Alves et al., 2022). Au contraire, chez certaines espèces de *Vibrio*, le QS régule négativement l'expression du T6SS (Gode-Potratz and McCarter, 2011; Guckes et al., 2023; Ishikawa et al., 2009). La régulation par le QS est intéressante car elle permet une réponse coordonnée des bactéries face à leur environnement. Toutefois, les molécules signal peuvent être partagées entre différentes espèces bactériennes, ce qui peut entraîner des interférences dans la régulation du T6SS comme montré récemment chez le symbionte de la seiche, *Vibrio fischeri* (Guckes et al., 2023).

7. Rôles du T6SS

a. Virulence des agents phytopathogènes

Jusqu'à présent, aucun effecteur T6SS n'a été décrit comme ciblant directement les cellules végétales. En revanche, de nombreuses études ont mis en évidence le rôle du T6SS dans la virulence des bactéries phytopathogènes.

Le T6SS peut impacter la virulence des bactéries pathogènes en interférant avec le système de sécrétion de type 3 (T3SS), facteur de virulence essentiel chez les bactéries Gram-négatives phytopathogènes (Deng et al., 2017; Leung et al., 2011; Moscoso et al., 2011). C'est le cas par exemple chez *Xanthomonas perforans*, un agent phytopathogène transmis par les graines et responsable de la maladie des tâches foliaires chez la tomate (Liyanapathirana et al., 2021). La délétion du gène *tssM* du cluster *i3**-T6SS de cette souche entraîne une augmentation de la population de *X. perforans* au niveau des plantes de tomate, ce qui provoque un développement plus précoce des symptômes sur feuille et une sévérité plus importante de la maladie (Liyanapathirana et al., 2021). Ainsi, au lieu d'augmenter la virulence et la sévérité de la maladie causée par *X. perforans*, le T6SS semble limiter l'agressivité de l'agent phytopathogène. En retardant la phase symptomatique, le T6SS contribue ainsi à prolonger l'interaction entre *X. perforans* et l'hôte, ce qui assure une dissémination réussie de l'agent phytopathogène dans l'espace (Liyanapathirana et al., 2021). L'analyse transcriptomique du mutant *tssM-i3** dans un milieu mimant l'environnement apoplastique des plantes a révélé que *TssM-i3** régule positivement l'expression de plusieurs gènes associés à la virulence, tels que le système de sécrétion de type 3 (T3SS), la mobilité et le chimiotactisme (Ramamoorthy et al., 2023). Chez *Xanthomonas citri* pv. *citri* (agent causal du chancre asiatique des agrumes) les gènes du T6SS sont surexprimés lors de la colonisation de la surface des feuilles d'oranger doux (Ceseti et al., 2019). Une fois à l'intérieur des feuilles (i.e. au niveau des mésophylles), la bactérie réprime son T6SS et surexprime son T3SS pour infecter son hôte, ce qui suggère une régulation croisée entre ces deux systèmes (Ceseti et al., 2019). Le T6SS de *X. citri* pv. *citri*, impliqué dans la résistance de la bactérie à la prédation par les amibes, permettrait à l'agent pathogène de s'adapter à la surface des feuilles avant qu'il n'infecte son hôte (Bayer-Santos et al., 2018; Ceseti et al., 2019). Une observation similaire a été faite pour *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae* (agent causal du chancre du kiwi) dont les gènes du T6SS sont surexprimés

immédiatement après le contact avec l'hôte, lors de la phase précoce d'infection (1,5-3h post-inoculation) (McAtee et al., 2018). L'induction du T6SS permettrait à la bactérie de s'adapter rapidement à la surface des feuilles avant qu'elle n'infecte son hôte en surexprimant les gènes codant le T3SS et les effecteurs T3SE associés (McAtee et al., 2018). Chez la souche *P. syringae* pv. *actinidiae* M228, le T6SS participe à l'adaptation de la bactérie à son environnement grâce à ses activités antimicrobiennes et en augmentant la tolérance de la bactérie au H₂O₂, une espèce réactive de l'oxygène produite par les plantes en réponse à l'attaque par des organismes phytopathogènes (Wang et al., 2021). La mutation des gènes T6SS réduit la capacité de *P. syringae* pv. *actinidiae* M228 à coloniser les vaisseaux des feuilles de kiwi et entraîne une réduction de 70% de la taille des lésions au point d'inoculation au niveau des branches (Wang et al., 2021). Cette réduction de symptômes peut notamment être expliquée par la sous-régulation des gènes du T3SS chez le mutant T6SS (Wang et al., 2021).

Chez d'autres bactéries phytopathogènes, le T6SS joue un rôle dans leur pathogénicité en impactant d'autres facteurs de virulence comme la mobilité, la formation de biofilm ou encore la production d'EPS. Par exemple, chez *Xanthomonas phaseoli* pv. *manihotis* (agent causal de la bactériose du manioc) le T6SS joue un rôle dans la mobilité des bactéries et sa délétion entraîne une diminution de la virulence de la bactérie (Montenegro Benavides et al., 2021). Chez *Erwinia amylovora* (agent causal du feu bactérien), le T6SS contribue à la virulence en influençant la production d'exopolysaccharides, facteurs de virulence chez cette bactérie (Tian et al., 2017). *Ralstonia solanacearum* (un agent causal du flétrissement bactérien d'un grand nombre de cultures) utilise son T6SS pour sa virulence sur la tomate et l'aubergine (Asolkar and Ramesh, 2020; Zhang et al., 2012; Zhang et al., 2014). Sur la tomate, l'absence du T6SS affecte sa virulence en raison d'un défaut dans la production de biofilm et d'une réduction de la motilité (Zhang et al., 2014).

Pour d'autres bactéries phytopathogènes, ce sont les compétitions intermicrobienne médiées par le T6SS qui leur permettent de coloniser efficacement les plantes et de les infecter. Par exemple, chez *Acidovorax citrulli* (agent causal de la tâche bactériennes des fruits chez les cucurbitacées), la délétion de gènes du T6SS entraîne un défaut de transmission de l'agent phytopathogène lors de la germination des graines de melon (Tian et al., 2015). Ce défaut de transmission entraîne une diminution de la maladie au niveau des plantules de melon âgées de 12 jours (Tian et al., 2015). Une étude récente a révélé que le T6SS d'*A. citrulli* n'est pas

directement impliqué dans la virulence de la bactérie mais est essentielle à sa survie dans la phyllosphère lorsqu'elle est inoculée avec 10 souches bactériennes isolées de cet environnement (Kan et al., 2023).

b. Protection des plantes

Par ses activités antimicrobiennes, le T6SS peut jouer un rôle crucial dans la protection des plantes envers les agents phytopathogènes. C'est le cas par exemple de la bactérie saprophyte du sol *Pseudomonas putida* KT2440. Cette souche possède trois clusters T6SS impliqués dans l'antibiose de différents agents phytopathogènes *in vitro* : *Xanthomonas campestris*, *Agrobacterium tumefaciens*, *Pectobacterium carotovorum* et *Pseudomonas syringae* (Bernal et al., 2017). Cette activité antimicrobienne permet de réduire la population de *X. campestris* et les symptômes sur feuille de tabac lorsque l'agent phytopathogène est co-infiltré avec *P. putida* KT2440 (Bernal et al., 2017). Un autre exemple concerne *Paraburkholderia sabiae* LMG24235 qui possède deux T6SS dont l'un est impliqué dans l'antibiose de plusieurs agents phytopathogènes et symbiontes de plantes appartenant aux familles des *Burkholderiaceae*, *Pseudomonadaceae*, et *Enterobacteriaceae* (Hug et al., 2023). Cette activité antimicrobienne permet à *P. sabiae* LMG24235 de protéger partiellement les tubercules de pommes de terre de la maladie de la pourriture molle causée par *Pectobacterium carotovorum* (Hug et al., 2023). De la même manière, *Pseudomonas fluorescens* MFE01 protège les tubercules de pommes de terre de la pourriture molle causée, cette fois-ci, par *Pectobacterium astrosepticum* (Bourigault et al., 2023). Cette protection fait intervenir le T6SS de *P. fluorescens* MFE01 qui sécrète un effecteur, Tae3, toxique pour l'agent phytopathogène qui voit sa population chuter lorsqu'il est inoculé avec *P. fluorescens* MFE01 au niveau des tubercules (Bourigault et al., 2023). *Pantoea endophytica*, isolée de branche de kiwi, possède un T6SS impliqué dans l'antibiose de diverses souches de *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae* permettant de réduire les symptômes du chancre bactérien causé par *P. syringae* pv. *actinidiae* au niveau du kiwi (Shao et al., 2023). Le T6SS d'*Acidovorax citrulli* possède des activités antimicrobiennes envers l'agent phytopathogène *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*, permettant de réduire les symptômes de la bactériose du riz causées par *X. oryzae* (Kan et al., 2023).

c. Interactions mutualistes avec les plantes

Le T6SS peut jouer un rôle dans les interactions symbiotiques légumineuse-*Rhizobium*. Quelques études ont mis en lumière un lien entre le T6SS, la formation de nodules et/ou la capacité des *Rhizobium* à fixer l'azote (Bladergroen et al., 2003; De Sousa et al., 2023; Salinero-Lanzarote et al., 2019; Tighilt et al., 2022). Chez *Rhizobium leguminosarum* RBL5523, une bactérie capable d'induire la formation de nodules mais incapable de fixer l'azote, la mutation des gènes *imp* (i.e. impaired in nodulation) restaure sa capacité de fixation de l'azote (Bladergroen et al., 2003). Il a fallu attendre la découverte et la description du T6SS pour comprendre que les gènes *imp* étaient en réalité des composants structuraux du T6SS. Chez certaines *Rhizobium*, le T6SS impacte donc négativement les relations symbiotiques avec les légumineuses. A l'inverse, chez d'autres espèces, le T6SS impacte positivement les interactions symbiotiques. C'est le cas pour *Rhizobium etli*, une bactérie capable d'induire la formation de nodule et de fixer l'azote. La mutation du T6SS chez cette bactérie entraîne une diminution significative du nombre de nodules au niveau des racines du haricot commun mais n'impacte pas la capacité de *R. etli* à fixer l'azote (Salinero-Lanzarote et al., 2019). L'impact positif du T6SS sur la formation de nodules serait notamment dû à l'activité antimicrobienne du T6SS de *R. etli* qui favoriserait la colonisation de la bactérie au niveau des racines (De Sousa et al., 2023). De la même manière, la mutation du T6SS de *Bradyrhizobium* sp. LmicA16 entraîne la diminution du nombre et de la taille des nodules au niveau de deux espèces de lupin. Cette diminution est attribuée à un défaut de colonisation dû à la mutation du T6SS (Tighilt et al., 2022). Ainsi, le T6SS peut impacter positivement ou négativement les interactions symbiotiques légumineuse-*Rhizobium*. Toutefois, ces impacts semblent majoritairement dus au rôle du T6SS dans la capacité des bactéries à coloniser les racines plutôt qu'à un potentiel dialogue moléculaire avec la plante médié par le T6SS.

d. Attachement et colonisation

Comme mentionné précédemment, le T6SS peut impacter la motilité, la formation de biofilm et par conséquent l'attachement et la colonisation des bactéries au niveau de leurs habitats. L'implication du T6SS dans la régulation des flagelles et la formation de biofilm ont tout d'abord été observées chez *E. coli* (de Pace et al., 2011). La délétion de TssM chez cette souche entraîne un défaut dans la motilité et la formation de biofilm (de Pace et al., 2011). C'est le cas

également chez *Citrobacter freundii* pour laquelle la mutation du T6SS entraîne une sous-régulation des gènes codant le système flagellaire (Liu et al., 2015). Chez cette bactérie, le T6SS est impliqué dans la motilité, l'adhésion et la cytotoxicité envers les cellules épithéliales humaines (Liu et al., 2015). Le lien entre T6SS et flagelles a également été mis en évidence chez *Pseudomonas fluorescens* MFE01. La mutation d'une des trois protéines Hcp (Hcp1) entraîne un défaut dans la motilité de *P. fluorescens* MFE01, associée à l'absence de flagelles (Bouteiller et al., 2020; Decoin et al., 2015). La présence de la protéine Hcp1 est également indispensable à *P. fluorescens* MFE01 pour inhiber la mobilité des cellules cibles. Au niveau mécanistique, il serait probable que Hcp1 participe à la sécrétion de FlgM (un facteur anti-sigma) dans les cellules cibles. FlgM séquestrerait alors FliA (le régulateur de la synthèse du flagelle), empêchant ainsi la synthèse de flagelles par les cellules cibles (Bouteiller et al., 2020). Cette réduction de motilité permettrait à *P. fluorescens* MFE01 de promouvoir le contact nécessaire pour l'activité antibactérienne du son T6SS (Decoin et al., 2015). Chez *Aeromonas veronii* TH0426, la délétion de Hcp1 abolit également la formation de flagelle, ce qui a pour conséquence de réduire significativement la formation de biofilm, ainsi que l'attachement et l'invasion des bactéries au niveau des cellules endothéliales (Y., Wang et al., 2023). Chez *Acidovorax citrulli*, la formation de biofilm est impactée lorsque le T6SS est muté (Tian et al., 2015). Le même phénotype est observé chez *P. aeruginosa* PA14 lorsque le H3-T6SS est muté (Yang et al., 2022). Dans cette étude, les chercheurs ont identifié un effecteur impliqué dans la formation de biofilm, TepB (T6SS effector promoting biofilm formation) (Yang et al., 2022). Par son activité, TepB permet à *P. aeruginosa* de résister à des stress oxydatifs, acides et osmotiques. La délétion de cet effecteur entraîne un défaut dans la motilité des bactéries et la formation de biofilm, ce qui a pour conséquence d'impacter la virulence de la bactérie envers le nématode *Caenorhabditis elegans* (Yang et al., 2022).

e. Transferts horizontaux de gènes

Le transfert horizontal de gènes (HGT) désigne le processus par lequel des gènes ou des fragments d'ADN sont échangés entre différents organismes. Le transfert horizontal de gènes est un mécanisme essentiel dans l'évolution bactérienne. Il permet la diffusion de nouveaux traits génétiques au sein des populations bactériennes, favorisant ainsi leur adaptation à de nouveaux environnements et conditions. L'implication du T6SS dans les HGT a initialement été

mise en évidence chez *Vibrio cholerae* (Borgeaud et al., 2015). L'activité antimicrobienne du T6SS de *V. cholerae* entraîne la lyse des cellules cibles, provoquant ainsi le relargage de leur ADN. Une fois accessible, cet ADN est capturé et utilisé par les bactéries prédatrices, montrant ainsi l'implication du T6SS dans les transferts horizontaux de gènes (Borgeaud et al., 2015). La lyse induite par le T6SS augmente les taux de HGT et permet à *V. cholerae* d'acquérir des fragments longs de plus de 150kb comparativement à une lyse indépendante du T6SS qui déclenche rarement un transfert d'ADN et entraîne des échanges d'ADN plus courts (Matthey et al., 2019). L'implication du T6SS dans les HGT a également été mis en évidence chez *Acinetobacter baylyi* ADP1 qui sécrète des effecteurs lytiques promouvant les HGT (Ringel et al., 2017). En promouvant les HGT, le T6SS pourrait participer à l'acquisition de nouveaux couples effecteur/immunité ou de nouveaux clusters T6SS par les cellules productrices (Thomas et al., 2017)

8. T6SS et microbiote des plantes

Le T6SS est largement répandu parmi les bactéries associées aux plantes (Barret et al., 2013; Bernal et al., 2018), et son rôle crucial dans la colonisation des plantes a été souligné précédemment. Plusieurs études ont également démontré que les compétitions médiées par le T6SS peuvent entraîner des répercussions sur les populations de cellules cibles *in planta*. Par conséquent, il est plausible d'émettre l'hypothèse que le T6SS pourrait jouer un rôle dans la structuration du microbiote des plantes. En influençant directement un ou plusieurs taxons, le T6SS pourrait moduler directement ou indirectement les interactions entre les microorganismes, et ainsi, impacter la dynamique de structuration des communautés. Malheureusement, les études sur le T6SS se limitent souvent à des systèmes simples impliquant seulement deux ou trois bactéries. De plus, les tests *in planta*, comme ceux mentionnés précédemment, se concentrent généralement sur l'impact du T6SS sur la population de la souche productrice ou celle des cellules cibles, laissant l'impact sur les communautés microbiennes relativement méconnu. Jusqu'à présent, une seule étude a exploré l'impact du T6SS sur la structuration des communautés bactériennes associées aux plantes (Wang et al., 2023). Il convient de noter que cette étude se concentre sur un cas spécifique, examinant l'effet du T6SS d'*Agrobacterium tumefaciens* C58 sur les communautés bactériennes associées à la galle du collet (i.e. gallobiome). Bien que le T6SS n'ait pas émergé comme le déterminant

principal de la composition bactérienne du gallobiome, les résultats ont révélé son influence sur la composition bactérienne en ciblant des taxons spécifique, sensibles au T6SS de *A. tumefaciens* C58 *in vitro* (Wang et al., 2023).

IV. *Stenotrophomonas rhizophila*

1. Taxonomie et habitats

Les bactéries du genre *Stenotrophomonas* sont des bactéries à Gram négatif appartenant à la classe des γ -protéobactéries (Moore et al., 1997). Elles sont classées dans la famille des *Lysobacteraceae* (anciennement *Xanthomonadaceae*) (Cutiño-Jiménez et al., 2020). Ce genre appartient au groupe phylogénétique appelé XSP qui comprend aussi les genres *Xanthomonas*, *Pseudoxanthomonas* et *Xylella* (Bansal et al., 2021; S., Kumar et al., 2019; Naushad and Gupta, 2013). Les genres *Xanthomonas* et *Xylella* incluent des espèces de bactéries pathogènes des plantes qui causent d'importants dommages dans diverses cultures à l'échelle mondiale (Sicard et al., 2018; Timilsina et al., 2020). Les genres *Stenotrophomonas* et *Pseudoxanthomonas* sont caractérisés par leur polyvalence et colonisent des habitats très variés comme l'eau, le sol, les sites contaminés, mais également les plantes et les animaux (Bansal et al., 2021; Chauviat et al., 2023; Fitzpatrick et al., 2018).

Le genre *Stenotrophomonas* a initialement été décrit avec l'espèce *Stenotrophomonas maltophilia* (Palleroni and Bradbury, 1993). Cette espèce a été très étudiée pour ses capacités de bioremédiation, et de promotion de la croissance/santé des plantes (Brooke, 2021; Mukherjee and Roy, 2016). Toutefois son utilisation en biotechnologie est limitée à cause de son potentiel pathogène pour l'homme (Brooke et al., 2017). Certains isolats environnementaux, initialement affiliés à l'espèce *S. maltophilia*, ont été regroupés en une nouvelle espèce, *S. rhizophila* (Minkwitz and Berg, 2001; Wolf et al., 2002). Contrairement à *S. maltophilia*, l'espèce *S. rhizophila* n'est pas capable de croître à 37°C, (Alavi et al., 2014) et peut utiliser le xylose comme source de carbone (Wolf et al., 2002). Les souches de *S. rhizophila* ont non seulement un potentiel de promotion de la croissance des plantes (Alavi et al., 2014; Pinski et al., 2020) mais également des capacités de bioremédiation *via* le stockage de métaux lourds comme le chrome, le cuivre, le plomb et le zinc (Gao et al., 2020; Sun et al., 2021) ou la dégradation de polluants environnementaux comme le polyvinyl alcohol (PVA) ou le diuron (Silambarasan et al., 2020).

2. Croissance des plantes

Certaines souches de *S. rhizophila* favorise la croissance des plantes en mettant à disposition des nutriments essentiels et sont alors considérées comme des *Plant Growth Promoting Bacteria* ou PGPB. Ainsi, elles produisent des sidérophores, qui facilitent l'absorption de minéraux essentiels tels que le fer, solubilisent des composés comme le phosphate inorganique et le potassium, et produisent de l'ammoniac (A., Kumar et al., 2019; Silambarasan et al., 2020; Wang et al., 2022). De plus, elles contribuent activement à la promotion de la croissance des plantes en produisant de l'acide indolacétique (AIA), une hormone végétale de la classe des auxines qui régule notamment l'allongement et la division cellulaire, favorisant ainsi l'expansion des racines et l'absorption de nutriments supplémentaires dans le sol (Glick, 2012; Suckstorff and Berg, 2003). Les souches de *S. rhizophila* peuvent également produire l'ACC désaminase, une enzyme qui dégrade l'acide 1-aminocyclopropane-1-carboxylique (ACC), un précurseur de l'éthylène. L'ACC désaminase permet alors de limiter l'action de l'éthylène, une hormone végétale produite en réponse à divers stress et inhibant la croissance des plantes (Glick et al., 2007; Glick, 2012). En réponses aux exsudats racinaires de colza, la souche type *S. rhizophila* DSM14405 produit de la spermidine, un régulateur de croissance des plantes qui joue un rôle dans la germination des graines et l'élongation des racines (Alavi et al., 2013; Tiburcio and Alcázar, 2018). Lorsqu'elle est inoculée dans le sol, elle participe à l'amélioration de la nutrition du colza en recrutant des rhizobactéries diazotrophes comme les Cyanobactéries et les Actinobactéries et en promouvant l'ammonification (Y., Liu et al., 2021). Ceci permet alors d'améliorer la nutrition azotée des plantes qui voient leur teneur en azote et leur activités protéiques augmenter (Y., Liu et al., 2021). De plus, la présence de *S. rhizophila* DSM14405 dans la rhizosphère du colza préserve la diversité des espèces bactériennes au cours du développement de la plante. Ceci entraîne des modifications significatives dans les propriétés chimiques du sol, avec une augmentation notable de nutriments essentiels tels que l'aluminium, le potassium, le phosphore, l'ammonium et le nitrate (Y., Liu et al., 2021). L'impact de *S. rhizophila* DSM14405 sur le microbiote des plantes ne se limite pas à la part bactérienne puisque cette souche est également capable de favoriser la croissance des plantes de tomate en modifiant la structuration du microbiote fongique (Schmidt et al., 2012). Comme nous le verrons un peu plus tard, cet impact peut être dû à ses capacités antagonistes envers divers genres fongiques telles que *Fusarium*, *Gaeumannomyces*, *Botrytis*, *Alternaria* et *Pythium*

(Egamberdieva et al., 2011; Schmidt et al., 2012; Wolf et al., 2002). Le potentiel PGPB des *S. rhizophila* a également été mis en évidence chez la souche *S. rhizophila* FT2 isolée à partir de graines de réglisse chinoise *Glycyrrhiza uralensis*. Cette souche impacte positivement la germination des graines et la vigueur des plantules de *G. uralensis* (Wang et al., 2022). De plus, elle favorise l'augmentation des activités phosphatase et catalase dans le sol rhizosphérique et contribue à accroître les concentrations en azote et phosphore assimilables (Wang et al., 2022). Les bénéfices des *S. rhizophila* pour les plantes ne se limitent pas à la promotion de leur croissance. Ces souches démontrent également des capacités à protéger les plantes contre divers stress, qu'ils soient d'origine biotique, tels que les attaques par des agents pathogènes, ou abiotique, comme le stress salin (Egamberdieva et al., 2011).

3. Mécanismes de résistance aux stress abiotiques

Le stress salin, qui constitue l'un des principaux facteurs limitant la productivité agricole à l'échelle mondiale, entraîne des pertes significatives de rendement dans les cultures (Ha-Tran et al., 2021). Face à des conditions de forte salinité, les plantes peuvent améliorer leur tolérance grâce à la présence de microorganismes bénéfiques (Peng et al., 2023). Cette tolérance résulte en partie de la synthèse de solutés compatibles, également appelés osmoprotecteurs, par les bactéries. Cela favorise leur survie dans des environnements caractérisés par une osmolarité changeante, tels que la rhizosphère (Miller and Wood, 1996). Les bactéries de l'espèce *S. rhizophila* sont capables de synthétiser et d'accumuler des osmoprotecteurs tels que le tréhalose et le glycosylglycérol en réponse à un stress salin, leur permettant ainsi de résister jusqu'à des concentrations de 4% de NaCl (Hagemann et al., 2008; Roder et al., 2005; Wolf et al., 2002). Cette tolérance aux fortes concentrations en sel permet à ces bactéries de jouer un rôle essentiel dans la protection des plantes contre les stress salins (Zhuang et al., 2023). L'application de *S. rhizophila* DSM14405 sur les graines de colza permet par exemple de réduire l'effet d'un stress salin causé par 2% NaCl, en augmentant le taux de germination de 16% à 64% (Zhuang et al., 2023). Le stress salin génère un excès d'espèces réactives de l'oxygène (ROS) dans les cellules végétales. Ces ROS, tels que les radicaux libres, peuvent endommager les composants cellulaires, y compris les protéines, les lipides et l'ADN, entraînant un stress oxydatif (Julkowska and Testerink, 2015). L'inoculation de *S. rhizophila* DSM14405 à une

concentration de 2.10^8 cellules par gramme de sol favorise les capacités antioxydantes du colza, ce qui permet à la plante de se protéger face au stress enduré (Zhuang et al., 2023). La protection des *S. rhizophila* face au stress salin intervient aussi sur les interactions bénéfiques entre la plante et d'autres bactéries associées. Par exemple, la souche *S. rhizophila* Sp-17 améliore significativement l'interaction symbiotique entre le soja et l'endosymbionte *Bradyrhizobium japonicum* BDYD1 en condition de stress salin (75 mM NaCl) (Egamberdieva et al., 2016). En effet, l'augmentation de la salinité a pour effet de réduire la colonisation de *B. japonicum* BDYD1 dans la rhizosphère du soja, entraînant une inhibition de la croissance des tiges et des racines, ainsi que de la nodulation. Cependant, la co-inoculation de *S. rhizophila* ep-17 et *B. japonicum* BDYD1 aboutit à des interactions synergiques qui se traduisent par l'amélioration de la longueur des racines et des tiges, une augmentation significative du poids sec des plantes, une meilleure absorption d'azote et de phosphore, ainsi qu'une augmentation significative du nombre de nodosités (Egamberdieva et al., 2016).

4. Mécanismes de résistance aux stress biotiques

Les bactéries de l'espèce *S. rhizophila* suscitent un intérêt considérable en raison de leur potentiel de biocontrôle, en particulier contre les agents phytopathogènes fongiques. Leurs propriétés antifongiques découlent en grande partie de leur capacité à sécréter diverses enzymes lytiques, notamment des lipases, chitinases, RNAases, DNases, protéases et glucanases, ainsi que de leur capacité à produire de composés volatiles antifongiques ou fongistatiques (Berg et al., 2010; Reyes-Perez et al., 2019; Vespermann et al., 2007). Une souche marine de *S. rhizophila* peut par exemple protéger les manguiers contre *Colletotrichum gloesporioides*, un agent pathogène fongique responsable de l'anthracnose, en exerçant des activités lytiques β -1,3-glucanase et chitinase. De plus, cette souche produit des composés volatiles qui réduisent la croissance mycélienne du champignon de 50%, diminuent l'incidence de la maladie de 90%, et réduisent les diamètres des lésions de 80%. Cette bactérie produit également des sidérophores, ce qui la rend très compétitive pour les ressources et entraîne l'inhibition de la germination des spores de *C. gloesporioides* à hauteur de 90% (Hernandez Montiel et al., 2017; Reyes-Perez et al., 2019). D'autres souches de *S. rhizophila*, telles que *S. rhizophila* KM01 et *S. rhizophila* KM02, inhibent la croissance mycélienne de *P. ultimum* par le biais de leur activité β -1,3-glucanase, réduisant ainsi l'incidence de la maladie chez les poivrons

(Lara-Capistran et al., 2020). Une autre souche de *S. rhizophila* est capable d'inhiber la germination des spores et la croissance mycélienne de *F. proliferatum*, ce qui lui permet de protéger le melon contre la pourriture du fruit provoquée par le champignon phytopathogène (Rivas-Garcia et al., 2018). Les bactéries de l'espèce *S. rhizophila* produisent de nombreux composés volatiles (Kai et al., 2007; Raio et al., 2023). La souche *S. rhizophila* P96, isolée de la rhizosphère du colza, produit 9 VOCs (Volatil Organic Compound) et est capable d'inhiber la croissance mycélienne de *Rhizoctonia solani* à hauteur de 94%. La souche *S. rhizophila* Ep2.2, isolée de la phyllosphère d'hibiscus de Syrie (*hibiscus syriacus*), produit jusqu'à 10 VOCs et est capable d'inhiber la croissance d'*Alternaria alternata* et *Botrytis cinerea in vitro*. Lorsqu'elle est inoculée sur les feuilles de tomates, *S. rhizophila* Ep2.2 parvient à réduire l'infection par *B. cinerea* tout en stimulant l'expression de gènes de défense chez la plante (Raio et al., 2023). En présence d'agents phytopathogènes, la protection des plantes par *S. rhizophila* ne se limite en effet pas à ses capacités antagonistes, mais elle inclut également sa capacité à renforcer les mécanismes de défense des plantes. Par exemple, lorsque le blé est exposé à *F. pseudograminearum*, *S. rhizophila* prolifère dans la rhizosphère du blé et améliore la croissance de la plante, tout en stimulant les gènes de défense de cette dernière (H., Liu et al., 2021). De la même manière, *S. rhizophila* FT2 protège le concombre, non seulement par ses activités antifongiques, mais aussi par sa capacité à induire la production d'enzymes de défense par la plante en présence du champignon pathogène *F. oxysporum* (Wang et al., 2022). Capable d'inhiber la croissance mycélienne de divers champignons phytopathogènes tels que *Phyllosticta* sp., *F. acuminatum*, *B. cinerea* Pers., *F. oxysporum* Sacc et *Scutellariae botrytis*, *S. rhizophila* FT2 permet également de réduire la pourriture des racines causée par *F. acuminatum* au niveau de l'angélique de chine (famille des *Apiaceae*) (Wang et al., 2022).

Les *S. rhizophila* peuvent également avoir des activités antibactériennes et inhiber la croissance de bactéries phytopathogènes *in vitro* (Mourou et al., 2022; Torres-Cortés et al., 2019). Par exemple, La souche *S. rhizophila* BA102 inhibe la croissance de *Xylella fastidiosa*, l'agent pathogène causant le syndrome du déclin rapide de l'olivier (Mourou et al., 2022). Cette inhibition est notamment due la sécrétion de molécules diffusibles dans l'environnement extérieur (Mourou et al., 2022). Deux autres souches, dont celle étudiée dans cette thèse, sont capable d'inhiber la croissance de la bactérie phytopathogène *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* 8004 (Torres-Cortés et al., 2019).

5. *Stenotrophomonas rhizophila* et T6SS

Bien que l'espèce *S. rhizophila* fasse l'objet de nombreuses études concernant ses effets bénéfiques sur la croissance et la protection des plantes, il existe encore très peu d'informations sur la présence et le rôle des T6SS chez cette espèce bactérienne.

La souche type *S. rhizophila* DSM14005 possède un T6SS du groupe i4b (Alavi et al., 2014; Bayer-Santos et al., 2019). Des études de transcriptomique ont révélé que des stress salins à 2 et 3% de NaCl induisent l'expression des gènes du T6SS chez cette souche (Alavi et al., 2013; Y., Liu et al., 2022). En effet, après une période de 3 heures de culture liquide agitée, les gènes *tssM*, *tssA*, *hcp*, ainsi que trois gènes *vgrG*, présentent une surexpression. Cette réponse est observée à la suite de l'ajout d'une concentration de 3% de NaCl dans le milieu de culture lorsque les bactéries ont atteint la fin de leur phase exponentielle de croissance (Alavi et al., 2013). De la même manière, Liu et al (2022) ont détecté la surexpression des gènes *tssH* (*clpV*), *tssG*, *tssF*, *tssM*, *tagF* ainsi que deux *vgrG* après 24h de culture liquide agitée en milieu LB contenant 2% de NaCl (Y., Liu et al., 2022). Dans leur étude, les chercheurs ont étudié l'implication du quorum-sensing (DSF-QS) dans la tolérance de *S. rhizophila* DSM14405 au stress salin. Leurs résultats mettent en évidence l'implication des molécules de signalisation de type DSF (Diffusible Signal Factor) dans la surexpression des deux gènes *vgrG* détectés, ce qui suggère une réponse coordonnée des bactéries dans l'utilisation de leur T6SS (Y., Liu et al., 2022).

V. Objectifs de la thèse

L'assemblage du microbiote des plantes est dynamique tout au long du développement des plantes et fait appel à de nombreux processus écologiques (Herrera Paredes and Lebeis, 2016). Le point initial de cet assemblage est le microbiote des graines, acquis à travers trois voies distinctes (interne, florale et externe) qui dépendent à la fois des microorganismes et de l'espèce végétale considérés. Certains taxons bactériens et fongiques semblent très adaptés à l'habitat graine et sont détectés dans les microbiotes de graine de plus de 20 espèces végétales différentes (Simonin et al., 2022). La sélection par l'hôte, l'environnement et les interactions entre microorganismes jouent un rôle clé dans l'assemblage du microbiote des graines. Lors de la germination des graines, les communautés microbiennes associées aux graines sont confrontées à l'invasion des microorganismes telluriques colonisant ce nouvel espace riche en nutriments (Nelson, 2004). Les compétitions microbiennes sont intenses et seulement une partie du microbiote des graines est capable de se transmettre aux plantules et de coloniser les différents compartiments de la plante en croissance (Abdelfattah et al., 2021; Johnston-Monje et al., 2021). Pour avoir accès à l'espace et aux ressources nutritives, les microorganismes utilisent des mécanismes d'interférence qui leur permettent de tuer leurs compétiteurs. Parmi eux, les T6SS sont des mécanismes d'antagonisme dépendants du contact qui se révèlent être des armes redoutables. Les T6SS sont très largement distribués au sein des bactéries associées aux plantes (Bernal et al., 2018). Cette prévalence sous-entend un fort avantage compétitif pour les bactéries porteuses d'un ou plusieurs T6SS lors de la colonisation de leur hôte. En plus de l'avantage compétitif que peut procurer les T6SS aux bactéries qui en ont, ce mécanisme se révèle être une arme efficace pour limiter les populations d'agents phytopathogènes *in planta* (voir section II.7.2).

Hypothèses

Les bactéries porteuses d'un T6SS seraient plus compétitives et se transmettraient plus efficacement de la graine à la plantule

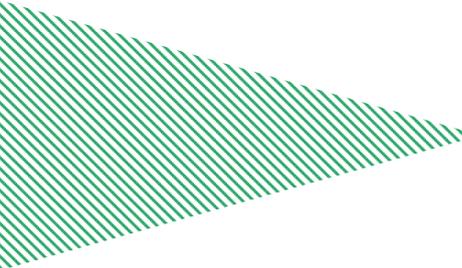
~

La présence de compétiteurs possédant un ou plusieurs T6SS pourrait altérer la transmission des agents pathogènes soit indirectement en influençant l'assemblage des communautés microbiennes, soit directement en exerçant une activité contre ces agents pathogènes

Pour répondre à ces hypothèses, ce projet de thèse porte sur l'étude du T6SS de *Stenotrophomonas rhizophila* CFP13503, une souche bactérienne isolée de graines de radis. Cette bactérie se transmet efficacement aux plantules en conditions gnotobiotiques (Simonin et al., 2023). Elle est également capable d'inhiber la croissance du phytopathogène *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* 8004 (Xcc8004) avec qui elle partage une proximité phylogénétique et métabolique (Torres-Cortés et al., 2019).

Questions

- (1) Est-ce que le T6SS de *S. rhizophila* CFBP13503 exerce une activité d'antibiose de contact *via* son T6SS vis-à-vis de la bactérie phytopathogène Xcc8004 ?
- (2) Est-ce que le T6SS de *S. rhizophila* CFBP13503 influence la transmission de Xcc8004 de la graine à la plantule ?
- (3) Est-ce que le T6SS influence la transmission de *S. rhizophila* CFBP13503 de la graine à la plantule lorsqu'elle est en compétition avec Xcc8004 ?
- (4) Est-ce que d'autres bactéries associées au microbiote des graines sont sensibles au T6SS de *S. rhizophila* CFBP13503 ?
- (5) Est-ce que les compétitions inter-bactériennes médiées par le T6SS de *S. rhizophila* CFBP13503 influencent la dynamique de structuration des communautés bactériennes ? Est-ce que la composition des communautés influence cet impact ?
- (6) Est-ce que les compétitions inter-bactériennes médiées par le T6SS de *S. rhizophila* CFBP13503 interfèrent dans la transmission du microbiote des graines et du sol aux plantules ?
- (7) Est-ce que les compétitions inter-bactériennes médiées par le T6SS favorisent la transmission de *S. rhizophila* CFBP13503 à la plantule lorsqu'elle est en compétition avec le microbiote de la graine et celui du sol ?
- (8) Est-ce que la composition du microbiote de la graine a une influence sur la transmission de *S. rhizophila* CFBP13503 ?



CHAPITRE 1

*Caractérisation du T6SS de S. rhizophila CFBP13503
et impact sur la transmission de l'agent phytopathogène
Xanthomonas campestris pv. campestris 8004*

I. Objectifs et stratégies

Le séquençage « long read » du génome de *S. rhizophila* CFBP13503 a révélé la présence d'un cluster T6SS au sein du génome de cette souche. Le premier objectif a donc été de :

(1) **Décrire le T6SS de *S. rhizophila* CFBP13503 :**

- **Déterminer à quel groupe il appartient par des analyses phylogénétiques.**
- **Décrire son organisation génomique.**
- **Identifier ses effecteurs potentiels et leurs activités.**

Comme peu de choses sont connues sur les T6SS des bactéries du genre *Stenotrophomonas* et ce, malgré leur intérêt pour les biotechnologies ou l'inquiétude que suscitent certaines espèces en tant que pathogènes humains émergents, il est apparu important d'**étudier la distribution des T6SS au sein du genre *Stenotrophomonas***. En effet, est-ce que les T6SS sont prévalents au sein de ce genre ? Est-ce que toutes les *S. rhizophila* ont un T6SS ?

Des études préliminaires menées par l'équipe de recherche ont révélé que lorsque *S. rhizophila* CFBP13503 et Xcc8004 sont en contact sur boîte de Petri, la population de Xcc8004 diminue après 24h de confrontation. Est-ce que le T6SS de *S. rhizophila* CFBP13503 est impliqué dans cette antibiose de contact ? Cette question a amené au deuxième objectif de ce chapitre :

(2) **Evaluer le rôle du T6SS de *S. rhizophila* CFBP13503 dans les compétitions inter-bactériennes et l'antibiose par contact de Xcc8004.**

Pour répondre à cet objectif et démontrer les différents impacts du T6SS dans cette thèse, nous avons construit des mutants de délétion dans le but de rendre le T6SS de *S. rhizophila* CFBP13503 non fonctionnel. Deux gènes structuraux du T6SS ont été ciblés : *hcp* et *tssB*. La construction de ces mutants nous a permis de comparer le phénotype sauvage et le phénotype mutant afin d'évaluer le rôle du T6SS dans l'antibiose envers Xcc8004.

Finalement, nous avons évalué l'hypothèse que les bactéries possédant un T6SS pourraient limiter la transmission des agents phytopathogènes de la graine à la plantule. Ainsi, notre dernier objectif était le suivant :

(3) Evaluer l'impact du T6SS de *S. rhizophila* CFBP13503 sur la transmission de Xcc8004 de la graine à la plantule.

Xcc8004 a été co-inoculée sur graine de radis avec la souche sauvage ou le mutant Δhcp de *S. rhizophila* CFBP13503. Les populations bactériennes ont été dénombrées à différents stades de développement (graine, graine germée et plantule) afin d'évaluer à quel moment un effet du T6SS sur la transmission de Xcc8004 pouvait être observé. Ces tests de transmission ont été effectués en conditions gnotobiotiques, à partir de graines stérilisées, afin de limiter les observations aux interactions entre les deux bactéries et la plante.

II. Contribution des auteurs

Dans ces travaux, j'ai réalisé les expériences, les analyses, la production des figures et la rédaction de l'article, conjointement avec Alain SARNIGUET et Matthieu BARRET. Martial BRIAND a entrepris l'assemblage et l'annotation du génome de *S. rhizophila* CFBP13503 et m'a aidé pour les analyses phylogénétiques des *Stenotrophomonas* et la phylogénie des T6SS au sein des *Lysobacteraceae*. Laure JOURNET m'a donné son appui et son expertise pour l'identification des effecteurs potentiels associés au T6SS de *S. rhizophila* CFBP13503. Elle a également participé à la rédaction de l'article sur la partie des effecteurs. Chrystelle BRIN, Agathe BRAULT et Anne PREVEAUX m'ont respectivement aidé pour la construction des mutants de délétion et la complémentation des mutants, les tests de confrontations *in vitro* et les tests de transmission *in planta*. Finalement, Marie SIMONIN m'a apporté son aide et son expertise sur le microbiote des graines et les tests de transmission au niveau du radis. L'ensemble des auteurs a participé à l'édition et à la révision de l'article ci-dessous, accepté pour publication dans *Molecular Plant Microbiology* en novembre 2023.

III. Résultats



Received: 20 July 2023 | Revised: 20 October 2023 | Accepted: 27 November 2023

DOI: 10.1111/mpp.13412

ORIGINAL ARTICLE

Molecular Plant Pathology WILEY

The type VI secretion system of *Stenotrophomonas rhizophila* CFBP13503 limits the transmission of *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* 8004 from radish seeds to seedlings

Tiffany Garin¹ | Chrystelle Brin¹ | Anne Préveaux¹ | Agathe Brault¹ | Martial Briand¹ | Marie Simonin¹ | Matthieu Barret¹ | Laure Journet² | Alain Sarniguet¹ ¹Univ Angers, Institut Agro, INRAE, IRHS, SFR QUASAV, Angers, France²Laboratoire d'Ingénierie des Systèmes Macromoléculaires, Institut de Microbiologie, Bioénergies et Biotechnologie, Institut de Microbiologie de la Méditerranée, Aix-Marseille Université-CNRS, UMR 7255, Marseille, France**Correspondence**

Alain Sarniguet, Univ Angers, Institut Agro, INRAE, IRHS, SFR QUASAV, Angers F-49000, France.

Email: alain.sarniguet@inrae.fr**Funding information**

Conseil Régional des Pays de la Loire; Institut National de Recherche pour l'Agriculture, l'Alimentation et l'Environnement

Abstract

Stenotrophomonas rhizophila CFBP13503 is a seedborne commensal bacterial strain, which is efficiently transmitted to seedlings and can outcompete the phytopathogenic bacterium *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* (Xcc8004). The type VI secretion system (T6SS), an interference contact-dependent mechanism, is a critical component of interbacterial competition. The involvement of the T6SS of *S. rhizophila* CFBP13503 in the inhibition of Xcc8004 growth and seed-to-seedling transmission was assessed. The T6SS cluster of *S. rhizophila* CFBP13503 and nine putative effectors were identified. Deletion of two T6SS structural genes, *hcp* and *tssB*, abolished the competitive advantage of *S. rhizophila* against Xcc8004 in vitro. The population sizes of these two bacterial species were monitored in seedlings after inoculation of radish seeds with mixtures of Xcc8004 and either *S. rhizophila* wild-type (wt) strain or isogenic *hcp* mutant. A significant decrease in the population size of Xcc8004 was observed during confrontation with the *S. rhizophila* wt in comparison with T6SS-deletion mutants in germinated seeds and seedlings. We found that the T6SS distribution among 835 genomes of the *Stenotrophomonas* genus is scarce. In contrast, in all available *S. rhizophila* genomes, T6SS clusters are widespread and mainly belong to the T6SS group i4. In conclusion, the T6SS of *S. rhizophila* CFBP13503 is involved in the antibiosis against Xcc8004 and reduces seedling transmission of Xcc8004 in radish. The distribution of this T6SS cluster in the *S. rhizophila* complex could make it possible to exploit these strains as biocontrol agents against *X. campestris* pv. *campestris*.

KEYWORDSinterbacterial competition, seed, seedling transmission, *Stenotrophomas rhizophila*, type VI secretion system, *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*

This is an open access article under the terms of the [Creative Commons Attribution-NonCommercial-NoDerivs](https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/) License, which permits use and distribution in any medium, provided the original work is properly cited, the use is non-commercial and no modifications or adaptations are made.

© 2024 The Authors. *Molecular Plant Pathology* published by British Society for Plant Pathology and John Wiley & Sons Ltd.

Mol Plant Pathol. 2024;25:e13412.
<https://doi.org/10.1111/mpp.13412>

wileyonlinelibrary.com/journal/mpp | 1 of 14

1 | INTRODUCTION

Disease emergence of plant pathogens is the result of changes in host range and/or pathogen dispersion into a new geographic area (Engering et al., 2013). Regarding this second point, seed transmission represents an important means of pathogen dispersion and is therefore significant in the emergence of plant diseases (Baker & Smith, 1966). Indeed, the International Seed Testing Association Reference Pest List v9 identified 333 seedborne pests (viruses, bacteria, fungi, oomycetes and nematodes) in more than 50 plant species (Denancé & Grimault, 2022). Of these seedborne pests, 145 are directly transmitted to plants (Denancé & Grimault, 2022).

Pathogens are not the only microorganisms that can be carried by seeds. More than 1000 bacterial and fungal taxa were identified in the seed microbiota of 50 plant species (Simonin et al., 2022). This important microbial diversity observed on seed samples is, however, more restricted at the scale of an individual seed with one dominant taxon of variable identity (Chesneau et al., 2022; Newcombe et al., 2018). Because the seed is a limited habitat in terms of resources and space, microbial competition is likely to play an important role in seed microbiota assembly. Using these competition processes to promote seed transmission of nonpathogenic microorganisms at the expense of plant pathogens could be deployed as a biocontrol-based strategy (Barret et al., 2016). However, this approach requires a better understanding of the mechanisms involved in these microbial competition processes, notably the relative importance of exploitative competition (i.e., increase uptake and use of nutrients) versus interference competition (i.e., limiting the access of other cells to resources; Granato et al., 2019).

The *Lysobacteraceae* (earlier known as *Xanthomonadaceae*) family includes numerous species of plant pathogens such as *Xanthomonas* spp. (Jacques et al., 2016) and also ubiquitous *Stenotrophomonas* spp. such as commensal *S. rhizophila* (Wolf et al., 2002) and opportunistic human pathogens such as *S. maltophilia* (Gröschel et al., 2020). *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* (Xcc), the causal agent of black rot disease of *Brassicaceae* (Vicente & Holub, 2013), is not only seed-transmitted in a range of *Brassicaceae* (Randhawa, 1984; Rezki et al., 2016; van der Wolf et al., 2019) but also in nonhost plants such as common bean (Darrasse et al., 2010). Diversity surveys of the radish seed microbiota have highlighted that Xcc shares the same habitat as numerous bacterial strains related to the *S. rhizophila* species (Rezki et al., 2016, 2018). Strains of *S. rhizophila* are efficient seedling colonizers of cotton, tomato, sweet pepper (Schmidt et al., 2012) and radish (Simonin et al., 2023) as well as commonly isolated in the rhizosphere of different plant species including rapeseed (Berg et al., 1996) and potato (Lottmann et al., 1999). The type strain of *S. rhizophila*, DSM14405^T, can protect plants against osmotic stress (Alavi et al., 2013; Egamberdieva et al., 2011) and limits the growth of fungal pathogens (Minkwitz & Berg, 2001). Other strains of *S. rhizophila* possess antibacterial activities (Lottmann et al., 1999). For instance, the strain *S. rhizophila* CFBP13503 decreases the population size of Xcc during in vitro confrontation assays (Torres-Cortés et al., 2019). This decrease in Xcc population size was attributed

to exploitative competition because these strains share significant overlap in resource utilization (Torres-Cortés et al., 2019). However, the role of interference competition was only partially assessed through the production of diffusible molecules, while contact-dependent mechanisms were not tested.

Among the contact-dependent mechanisms involved in inter-bacterial competition, the type VI secretion system (T6SS) is probably the most widely distributed with more than 17,000 T6SS gene clusters distributed in more than 8000 genomes sequences (source SecReT6 v3; Zhang et al., 2022). The T6SS is a multiprotein complex composed of several core components, including the membrane complex TssJLM, the baseplate TssEFGK, the tail tube Hcp (TssD), the spike composed of VgrG (TssI) trimers topped by a protein containing a Pro-Ala-Ala-Arg Repeat (PAAR) motif, the contractile sheath TssBC, and the coordinating protein TssA, as well as the sheath disassembly ATPase ClpV (also known as TssH) (Cherrak et al., 2019; Cianfanelli et al., 2016; Ho et al., 2014). The T6SS allows bacteria to compete and survive in their environments by injecting toxins/ effectors into target cells. Effectors are either fused (specialized effectors) to or interact (cargo effectors) with Hcp tube or VgrG/PAAR spike proteins (Cherrak et al., 2019; Cianfanelli et al., 2016; Jurénas & Journet, 2021). The contraction of the sheath leads to the injection of Hcp and VgrG/PAAR proteins together with the effectors. Effector-immunity encoding gene pairs are often associated with genes encoding the elements involved in their delivery. These include Hcp, VgrG or PAAR proteins, and also accessory proteins named chaperones/adaptors, which facilitate the loading of effectors onto the T6SS elements (Unterweger et al., 2017). Adaptors identified so far are DUF4123-, DUF1795-, DUF2169- and DUF2875-containing proteins encoded upstream of their cognate effector (Berni et al., 2019; Unterweger et al., 2017). If effector-immunity can be orphan genes, they are often encoded in T6SS clusters or associated with *hcp* or *vgrG* in orphan *hcp/vgrG*-islands. Conserved domains or motifs have also been described for some effectors and immunity proteins that facilitate their identification (Lien & Lai, 2017). For effector proteins, these conserved domains can reflect their biochemical toxic activity. Recruitment domains and motifs, such as MIX (Marker for type sIX effectors) or FIX (Found in type sIX effectors) motifs, DUF2345/TTR (Transthyretin-like domains) domains or Rhs (Rearrangement hot spot) domains, can be found in T6SS effectors and are related to their mode of delivery (Cherrak et al., 2019; Cianfanelli et al., 2016; Jurénas & Journet, 2021).

The T6SS secretion system is widespread among plant-associated bacteria and divided into five taxonomic groups (Bernal et al., 2018). The T6SS has been implicated in a wide range of biological processes, including microbial competition with bacteria and fungi (Luo et al., 2023; Trunk et al., 2018), epiphytic colonization of bacterial pathogens (Liyanapathiranaage et al., 2021), and pathogen virulence (Choi et al., 2020; Montenegro Benavides et al., 2021; Shyntum et al., 2015). *Pseudomonas putida* KT2440 K1-T6SS also provides biocontrol properties by killing *X. campestris* when injected into plant leaves (Bernal et al., 2017). Commensal bacteria from seed microbiota carrying a T6SS could be good candidates as biocontrol agents

and may be used to limit bacterial pathogen transmission from seed to seedling. In the course of this work, we explored the possibility of limiting Xcc transmission from seed to seedling through a contact-dependent T6SS mechanism mediated by *S. rhizophila*. We also ask to which extent strains from the *Stenotrophomonas* genus share similar or different T6SS clusters.

2 | RESULTS

2.1 | Genomic organization of *S. rhizophila* CFBP13503 T6SS

Fourteen genes encoding T6SS core protein components were identified in the genome sequence of *S. rhizophila* CFBP13503 (Figure 1). These genes, located on a single genomic cluster of 72 kb, include genes encoding proteins involved in the membrane complex (TssJ, L and M: HKJBHOBG_02310, 02312, 02279), the baseplate (TssE, F, G and K: HKJBHOBG_02304, 02303, 02302, 02311), the contractile sheath (TssB and C: HKJBHOBG_02307, 02306), the coordinating protein (TssA: HKJBHOBG_02276), the disassembly ATPase (TssH: HKJBHOBG_02301), the inner tube (Hcp: HKJBHOBG_02305) and the puncturing structure (VgrG and PAAR). Regarding the puncturing structure, multiple genes encoding VgrG ($n=7$) and PAAR domain-containing proteins ($n=5$) were detected in the genome sequence.

Based on the genetic architecture of the T6SS genomic cluster, the T6SS is related to group i4 (Bayer-Santos et al., 2019). The T6SS putative accessory genes were identified in the core structural cluster, including the group 4-specific: (a) the group 4-specific *tagX* (HKJBHOBG_02282), which encodes an L,D-endopeptidase first proposed to be involved in cell wall degradation for T6SS assembly (Weber et al., 2016), but essential for polymerization of the contractile sheath and not required for assembly of the

membrane complex and the baseplate (Lin et al., 2022); (b) *tagF* (HKJBHOBG_02278), which encodes a negative post-translational regulator of the *Pseudomonas aeruginosa* H1-T6SS (Lin et al., 2018); (c) *tagN/L* (HKJBHOBG_02277), whose role in T6SS assembly or regulation remains unknown; and (d) *tsIA* (HKJBHOBG_02308), conserved in i4b T6SS and involved in cell-contact T6SS assembly (Lin et al., 2022).

2.2 | The T6SS of *S. rhizophila* CFBP13503 encodes a wealth of putative effectors

To identify putative T6SS effectors of CFBP13503, we screened the T6SS main cluster and the *vgrG* and PAAR islands for the presence of VgrG, Hcp or PAAR proteins, as well as the presence of N-terminal effectors motifs such as FIX or MIX domains. We also looked for conserved domains encoded by the genes in the vicinity of *vgrG*, *hcp* or PAAR or adaptor/chaperones that could be cargo effectors associated with immunity proteins.

We identified only one Hcp protein, encoded in the main T6SS cluster in between *tssE* and *tssC* genes. Seven *vgrG* genes (*vgrG*-1 to *vgrG*-7) were identified, with five of them located adjacent to the T6SS cluster and two others scattered throughout the genome (Figure 2a,b). All VgrG proteins, except VgrG-6, contain a C-terminal DUF2345 domain extending the VgrG needle that can be important for recruiting effectors or carrying toxic activity (Flaughnatti et al., 2016, 2020; Storey et al., 2020). In contrast, VgrG-6 contains a C-terminal domain extension with a weak ($p=5.5e-03$) similarity to the Flic/FliB family flagellin (accession: cl35635). Five PAAR-containing proteins were detected in the genome of CFBP13503: one in the T6SS cluster, one in each *vgrG* island and two orphan PAAR proteins (Figure 2). The latter two PAAR-containing proteins possess a C-terminal Ntox15 domain

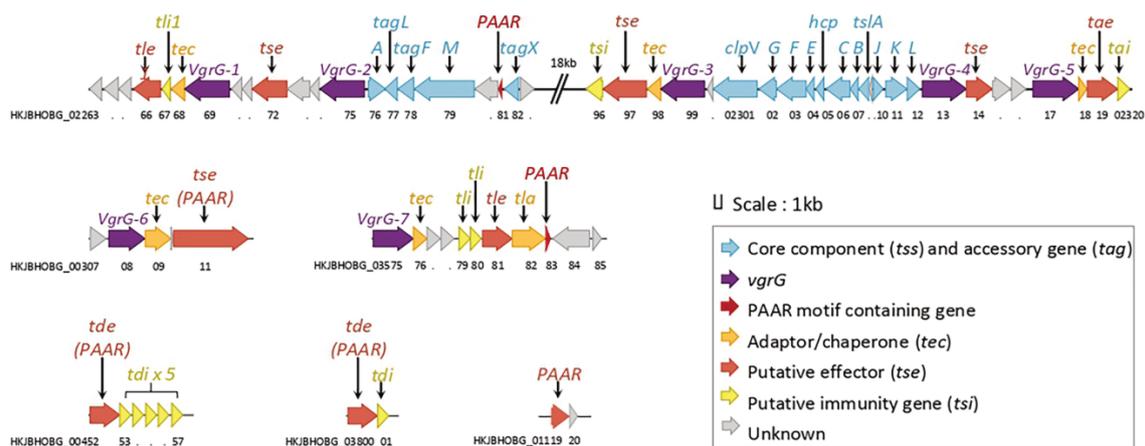
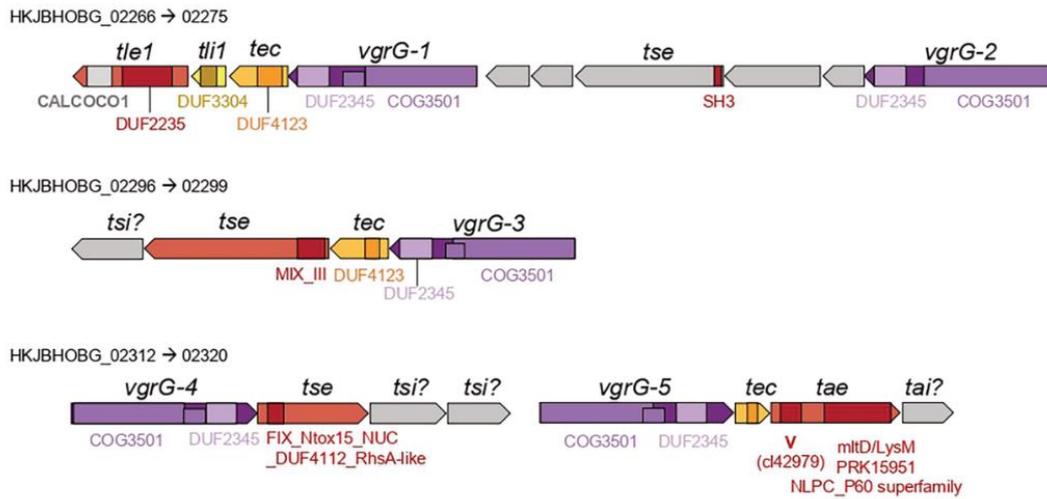


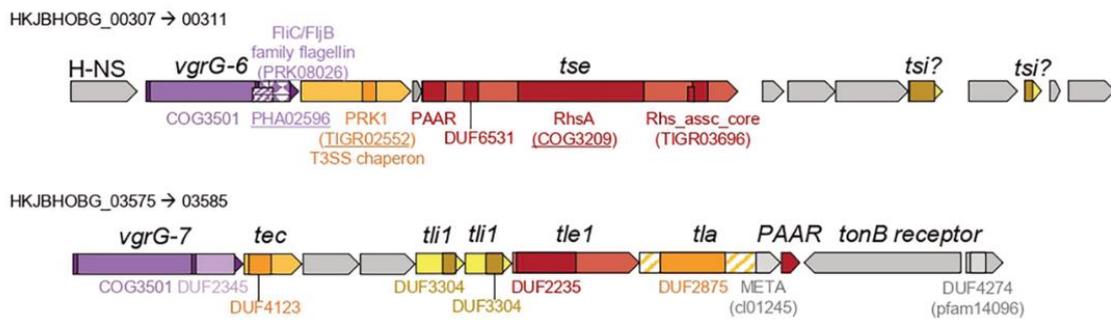
FIGURE 1 *Stenotrophomonas rhizophila* CFBP13503 type VI secretion system (T6SS) genomic architecture. Schematic representation of *S. rhizophila* CFBP13503 T6SS cluster along with orphan *vgrG* and PAAR clusters. Genes are coloured according to their functional roles: core component and accessory genes (blue), *vgrG* (violet), PAAR-motif containing genes (red), adaptor/chaperone (orange), putative effectors (orange-red), immunity genes (yellow), and genes with unknown function (grey).

(a) **vgrGs near the T6SS structural clusters**

Scale : 1kb



(b) **Orphan vgrGs**



(c) **Orphan paar**

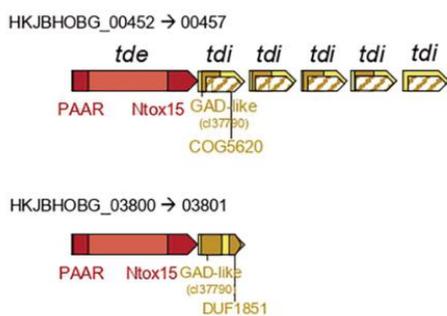


FIGURE 2 *Stenotrophomonas rhizophila* CFBP13503 type VI secretion system (T6SS) effectors. The conserved domain organization of genes encoding putative chaperone, effector and immunity proteins associated with (a) VgrG encoded in the main T6SS cluster, (b) orphan VgrG, and (c) orphan PAAR domain-containing effectors are represented. vgrG genes are indicated in violet, putative effectors with or without PAAR motif are shown in red, chaperone genes in orange, immunity protein genes in yellow and gene-encoded proteins with unknown functions are in grey.

(pfam15604) with a HxD catalytic motif. Such domains were found associated with T6SS effectors with DNase activity called Tde (Type VI DNase effector) (Luo et al., 2023; Ma et al., 2014). These two predicted PAAR-fused Tde proteins are associated with genes encoding the DUF1851 domain, known to be associated with T6SS Tde immunity proteins (Tdi) (Luo et al., 2023; Ma et al., 2014) (Figure 2c).

In addition to specialized effectors, we detected several putative cargo effectors, immunity proteins and chaperone proteins. Regarding chaperones, three DUF4123 domain-containing proteins were identified in coding sequences located immediately downstream of *vgrG-1*, *vgrG-3* and *vgrG-7*. Another chaperone containing a DUF2875 domain was also encoded in the vicinity of *vgrG-7*. Concerning effector, two effector-immunity (E-I) encoding gene pairs *tle/tli* were associated with *VgrG-1* and *VgrG-7*. Both *tle* encode proteins containing a GX SXG motif (GFSRG) and a DUF2235, characteristic of the T6SS phospholipase effector (Tle) of the Tle1 family (Flaunatti et al., 2016; Russell et al., 2013). Their corresponding Tli contained a DUF3304 domain found in several T6SS Tli1 immunity proteins (Russell et al., 2013). A putative amidase effector, *tae*, was associated with *VgrG-5*. This effector contained a murein transglycosylase D domain and a LysM motif involved in binding peptidoglycan, as well as an NlpC_P60 domain. Linked to the other *vgrG* genes, we also detected genes encoding T6SS effector-specific domains MIX and FIX. The MIX-containing effector located at the vicinity of *vgrG-3* and a *tec* protein-encoding gene may encode a pore-forming toxin. This toxin is predicted to encode four or five putative transmembrane domains at its C terminus. A predicted structure-based search using AlphaFold2 predicted structure and Foldseek suggest

that this protein shares structural homologies (over the 900 first residues) with VasX, a pore-forming toxin from *Vibrio cholerae* (Miyata et al., 2013). The downstream gene is a predicted inner membrane protein and could be the corresponding immunity protein. Unfortunately, we were unable to determine conserved domains or potential activities for the FIX-containing protein encoded downstream of *vgrG-4* so we referred to it as *tse*, which stands for 'type six effector'. Similarly, no function could be assigned to the proteins encoded by the genes downstream of *vgrG-4*. We assume that these genes could encode potential toxins and associated immunity proteins and potential chaperones. The 18 kb region between *tssM* and *tssA* and other structural genes contains a poly-immunity locus with a predicted formylglycine-generating enzyme family immunity protein encoding gene (Lopez et al., 2021) and eight duplications of the putative immunity gene HKJBHOBG_02263 containing a DUF6708 domain.

2.3 | *S. rhizophila* CFBP13503 outcompete Xcc8004 in vitro in a T6SS-dependent manner

S. rhizophila CFBP13503 is able to outcompete the phytopathogenic bacterial strain Xcc8004 in TSA10 (Torres-Cortés et al., 2019). After 6 h of confrontation on TSA10 medium between Xcc8004 and CFBP13503, a 10- to 100-fold decrease in Xcc8004 population was observed in comparison with Xcc8004 monoculture (Figure 3). Deletion of two genes encoding proteins involved in T6SS assembly (Δhcp and $\Delta tssB$) significantly increased the population size of Xcc8004 to a level comparable with Xcc8004 monoculture

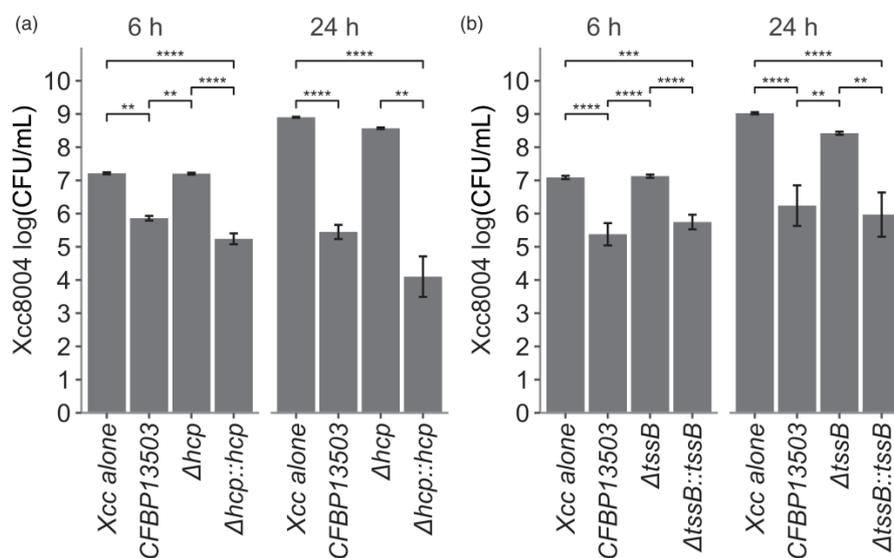


FIGURE 3 Bactericidal activity of *Stenotrophomonas rhizophila* CFBP13503 against *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* 8004 (Xcc8004). Confrontation between Xcc8004 and CFBP13503 wild-type, type VI secretion system (T6SS)-deficient mutants Δhcp (a) and $\Delta tssB$ (b) and the complemented mutants $\Delta hcp::hcp$ and $\Delta tssB::tssB$ in TSA10 medium for 6 and 24 h. Colony-forming units (CFU) were quantified on TSA10 supplemented with rifampicin. The averages \pm SD of nine replicates are plotted. Statistical analyses were performed using Dunn's multiple comparison test (** $p < 0.005$, *** $p < 0.0005$, **** $p < 0.00005$).

(Figure 3). Complementation of these two mutants restored the decrease in CFU of Xcc8004. These results demonstrate that the T6SS of *S. rhizophila* CFBP13503 is involved in the antibiosis towards Xcc8004 from 6 h of confrontation. The T6SS effect size increased with time as 24 h after confrontation Xcc8004 population decreased from 1000 to 10,000 times in the wild-type strain and complemented mutants. At 48 h, the Xcc populations were reduced by the wild-type compared with the deletion mutants but increased by one \log_{10} compared with the same wild-type treatment at 6 and 24 h (Figure S3). These results highlight the involvement of the T6SS of *S. rhizophila* CFBP13503 in the killing of Xcc8004 and thus its involvement in interbacterial competition.

2.4 | The T6SS of *S. rhizophila* CFBP13503 limits the seed-to-seedling transmission of Xcc8004 in radish

To investigate the bactericidal impact of CFBP13503 T6SS in planta, seedling transmission assays were carried out on radish seeds (Figure 4). Xcc8004 was co-inoculated with either the wild-type CFBP13503 strain or the Δhcp mutant on sterilized seeds with inoculum ratios of 1:2.1 and 1:1.6, respectively. Hcp protein is a structural protein of T6SS syringe but can exert antibiosis against bacterial prey (Decoin et al., 2014; Fei et al., 2022). Thus, we chose the hcp mutant to prevent any toxicity. Bacterial population sizes were measured on seeds, germinated seeds (1 day post-inoculation [dpi]) and the aerial and root parts of seedlings (5 dpi) by quantification of CFU on selective media. The Xcc8004 population of inoculated seeds was variable (6.1 to 6.5 \log_{10} CFU per sample) but presented no significant decrease when co-inoculated with wild-type CFBP13503 compared with the Δhcp mutant. However, a significant decrease in the Xcc8004 population was observed from the germinated seed stage when co-inoculated with the wild-type strain. This decrease persisted over time, with a significant reduction in Xcc8004 population size in the aerial and root part of seedlings during the confrontation with the wild-type CFBP13503 (Figure 4). The population size of *S. rhizophila* was not impacted by the presence or absence of a functional T6SS (Figure 4). Altogether these findings show that the T6SS of *S. rhizophila* CFBP13503 restricted seedling transmission of Xcc8004 without providing a fitness advantage to *S. rhizophila* CFBP13503.

2.5 | Analysis of T6SS distribution within the *Stenotrophomonas* genus

Given the significant effect of *S. rhizophila* CFBP13503 T6SS on Xcc8004, it raises the question of T6SS distribution within the *Stenotrophomonas* genus. A total of 835 *Stenotrophomonas* genome sequences were then collected from the NCBI (experimental procedure). These genome sequences are divided into 95 groups (Figure S1) at a threshold of 50% shared 15-mers, an overall genome

relatedness index employed as a proxy for species delineation (Briand et al., 2021). From this analysis, the strain CFBP13503 is grouped with *S. rhizophila* DSM14405^T in the same species complex (threshold 0.25) but differs from the DSM14405^T type strain of *S. rhizophila* (threshold 0.5). So, we describe here a new *S. rhizophila* complex.

Sixty-four strains (8.3% of the data set) of 22 groups contained at least one T6SS cluster (Figure 5). Based on the phylogenetic analysis of TssC (Figure 6), T6SS clusters were classified into three families i1 ($n=5$), i3 ($n=10$) and i4 ($n=57$). Just four species among the 28 groups of *S. maltophilia* species complex contain one T6SS except group 65, which contains two T6SS belonging to two different taxonomic groups (i3 and i4). All *S. rhizophila* strains ($n=5$) have a T6SS related to group i4.

3 | DISCUSSION

X. campestris pv. *campestris* is a frequent seed-colonizer of various host and nonhost plant species (Darrasse et al., 2010; Vicente & Holub, 2013). In the seed habitat, Xcc can co-occur with other bacterial species such as *S. rhizophila* CFBP13503 (Rezki et al., 2016), which can outcompete Xcc8004 in vitro (Torres-Cortés et al., 2019). Resource overlap was initially proposed as the mode of action involved in Xcc8004 growth reduction in the presence of *S. rhizophila* CFBP13503 (Torres-Cortés et al., 2019).

In this study, we showed that the growth inhibition of Xcc8004 by *S. rhizophila* CFBP13503 was T6SS-dependent. CFBP13503 decreased Xcc8004 population size from 10- to 1000-fold after 6 and 24 h of confrontation in solid medium, respectively. Deletion mutants of two genes encoding proteins (Δhcp and $\Delta tssB$) involved in T6SS assembly were no longer able to reduce Xcc8004 growth. After 48 h of confrontation in vitro, Xcc8004 strain partially escaped T6SS antibiosis due to the possible establishment of non-immune defences by Xcc such as the creation of dead cell barriers or the production of exopolysaccharides that limit cell-to-cell contact (Hersch et al., 2020). Antibacterial activities of T6SS can be contact-dependent with the translocation of effector proteins in bacterial cells (Jurénas & Journet, 2021) or contact-independent with the secretion of metal-scavenging proteins in the surrounding media (Chen et al., 2016; Lin et al., 2017; Si et al., 2017). When the confrontation between Xcc8004 and CFBP13503 took place in a liquid medium with limited cell contacts, no difference in Xcc8004 growth was observed between the wild-type strain and the T6SS-deficient mutants (Figure S4). In conclusion, T6SS-mediated reduction in Xcc8004 growth is contact-dependent and therefore due to the injection of protein effectors in Xcc8004 cells.

Furthermore, *S. rhizophila* CFBP13503 is involved in reducing the transmission of Xcc8004 from seed to seedling. When comparing equivalent Xcc8004 populations on seeds, the presence of *S. rhizophila* CFBP13503 negatively impacted the population of Xcc8004 on germinated seeds compared with the mutant strain lacking the T6SS gene hcp . This highlights the potential role of T6SS during the

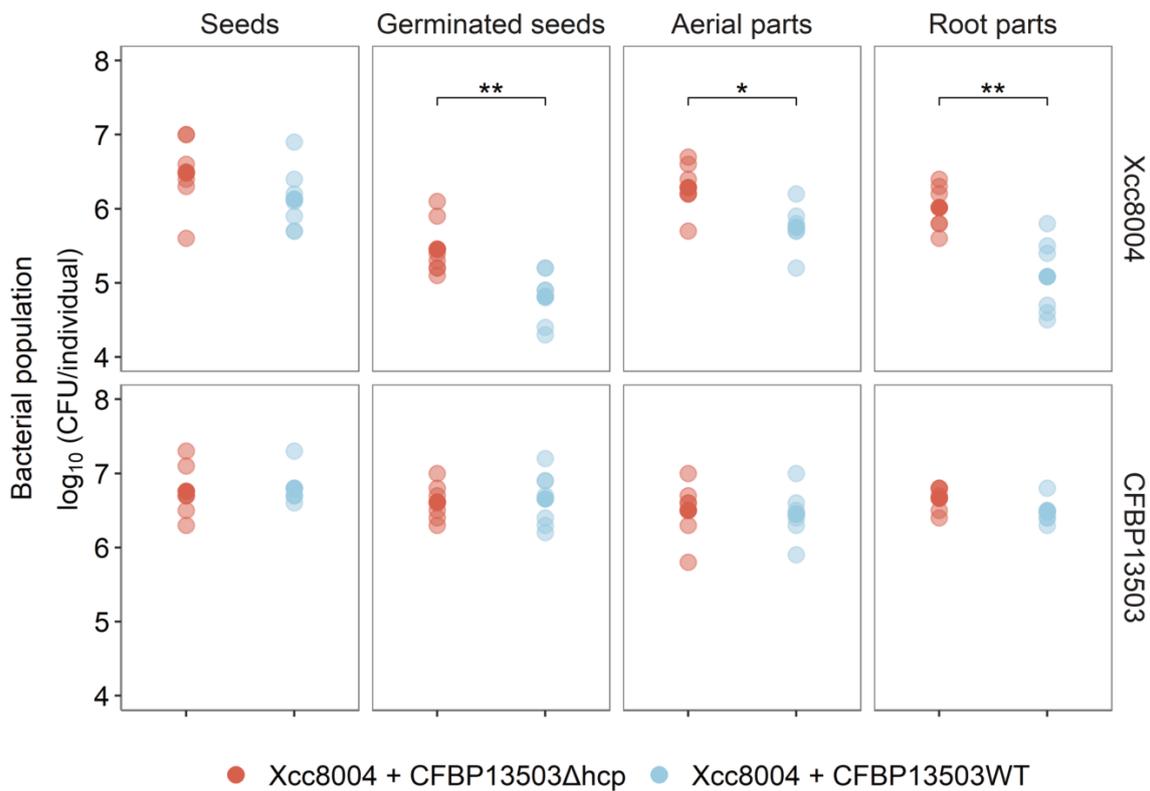


FIGURE 4 Bacterial population dynamics during seed-to-seedling transmission of *Stenotrophomonas rhizophila* CFBP13503 and *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* (Xcc8004) in radish. Radish seeds were co-inoculated with Xcc8004 and CFBP13503 wild-type or type VI secretion system (T6SS)-deficient Δhcp . Bacterial populations were assessed in radish seeds (0 days post-inoculation [dpi]), 24-h-old germinated seeds (1 dpi), 5-day-old seedling aerial parts, and 5-day-old seedling root parts (5 dpi). Colony-forming units (CFU) were quantified on selective media to differentiate Xcc8004 and CFBP13503 populations. The averages \pm SD of two experiments ($n=3$ and $n=4$) are plotted. Statistical analyses were performed using Dunn's multiple comparison test (* $p < 0.05$, ** $p < 0.005$).

early interactions between bacteria. The effects of *S. rhizophila* CFBP13503 T6SS persist overtime at the seedling stage, as a lower population of Xcc is observed in the presence of the wild-type strain. Because Xcc8004 is a seedborne pathogen, limiting its transmission to the seedling stage appears to be a promising strategy for managing this pathogen. However, further studies are needed on host plants to assess whether the T6SS of *S. rhizophila* CFBP13503 can limit the pathogenicity of Xcc8004 by reducing its population size.

It is also noteworthy that the presence or absence of T6SS, as well as its mutation, does not impact the transmission of *S. rhizophila* CFBP13503 when in competition with Xcc8004. Consequently, the T6SS of *S. rhizophila* CFBP13503 does not seem to be involved in its adhesion or colonization capacities of radish seed and seedling, unlike what has been observed in other bacterial species (Cassan et al., 2021; Mosquito et al., 2019).

S. rhizophila CFBP13503 possesses seven VgrG proteins, each of which is associated with a chaperone protein and a putative effector. This diversity of VgrG proteins may allow for various associations in the arrangement of VgrG trimers, enhancing the versatility of the T6SS. Additionally, *S. rhizophila* CFBP13503 has five PAAR-domains

containing protein. The presence of PAAR proteins sharpens the tip of the VgrG trimer, creating opportunities for different toxic effector associations during each firing event. Two of these PAAR proteins possess a C-terminal toxic domain related to DNase activity. The extensive repertoire of effectors identified in *S. rhizophila* CFBP13503 includes Tle1-type phospholipases (Flauggnatti et al., 2016; Russell et al., 2013) capable of lysing the membranes of target bacteria, DNases (Tde) that exhibit antibacterial properties by targeting nucleic acids, amidases (Tae) that degrade peptidoglycan to lyse the target bacterium, and potentially a pore-forming effector that inhibits the growth of target cells by depolarizing the inner membrane. Furthermore, there are other effectors whose activities have yet to be discovered. These effectors are predicted to target different components of bacterial cells, contributing to the antibacterial phenotype against Xcc8004. Interestingly, some components and effectors in *S. rhizophila* CFBP13503 could also exhibit anti-eukaryotic activity. For example, the DUF2345 domain of VgrG has been shown to intoxicate yeast, as demonstrated by *Klebsiella pneumoniae* VgrG4 (Storey et al., 2020). Moreover, the two 'evolved' PAAR proteins, which contain a C-terminal Ntox15 domain, share a significant

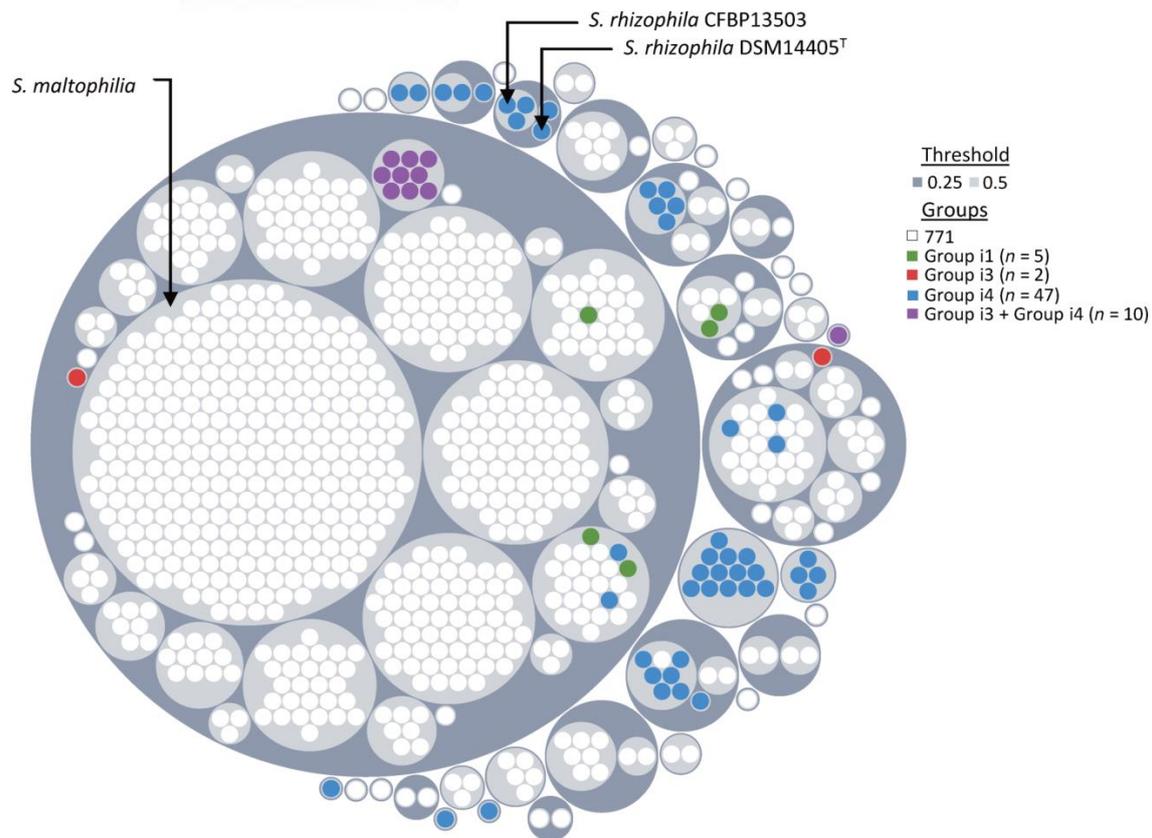


FIGURE 5 Type VI secretion system (T6SS) distribution among *Stenotrophomonas* sp. genomes ($n=835$). Circle packing representation of *Stenotrophomonas* sp. genomes ($n=835$). Overall genome relatedness was assessed by comparing the percentage of shared 15-mers. Each dot represents a genome sequence, colour-coded based on the T6SS group. The genomes were grouped using two distinct thresholds to assess species-specific relationships (0.5) and interspecies relationships (0.25). Interactive circle packing representation is available in [Figure S1](#). For the caption of species names when a reference strain exists see [Figure S2](#).

identity (>30%) with the DNase effector TafE of *Acinetobacter baumannii* strain 17,978, known for its involvement in yeast killing (Luo et al., 2023). Some Tle effectors were also shown to target bacteria and eukaryotic cells (Jiang et al., 2014, 2016). The combination of these diverse effectors, either individually or in synergy (LaCourse et al., 2018), probably contributes to the competitive advantage of *S. rhizophila* CFBP13503 over *Xcc* in vitro. Despite possessing only one T6SS, the diverse repertoire of effectors enables *S. rhizophila* CFBP13503 to effectively combat bacterial competitors and potentially exert antibacterial effects against *Xcc8004*.

The T6SS is not frequently found in *Stenotrophomonas* genomes. Less than 10% of the genome sequences analysed possessed a T6SS genetic cluster, which is generally presented in a single copy. This frequency is relatively low compared with other bacterial genera of the *Lysobacterales* where T6SS is present in approximately 50% of sequenced strains (Bayer-Santos et al., 2019). A novel subgroup 3 within *Lysobacterales*, exclusively associated with *Stenotrophomonas* species, was revealed by TssC-based phylogeny analysis. Notably, this subgroup was not identified in the previous study conducted by Bayer-Santos et al. (2019) on T6SS classification

within *Lysobacterales*. Consistent with their findings, our analysis also identified *Stenotrophomonas* T6SS classified into both group i1 and group i4. However, group i4 T6SS appears to be more prevalent within the *Stenotrophomonas* genus. This is the case for the T6SS of *S. rhizophila* CFBP13503 and more generally for strains affiliated with the *S. rhizophila* complex, including the type strain DSM14405^T (Wolf et al., 2002). *S. rhizophila* strains are not only known for their ability to colonize a wide range of plant species following seed inoculation (Schmidt et al., 2012; Simonin et al., 2023) but also to exhibit antifungal (Berg & Ballin, 1994) and antibacterial activities (Lottmann et al., 1999). For instance, the strain *S. rhizophila* DSM14405^T protects plants against *Fusarium solani* and displays antagonistic activity against various phytopathogenic fungi under high salt conditions (Egamberdieva et al., 2011). Interestingly, some T6SS genes of *S. rhizophila* DSM14405^T are strongly up-regulated in response to osmotic stress (Alavi et al., 2013; Liu et al., 2022). More available genomes from the *S. rhizophila* complex will confirm later the T6SS uniformity in these species. Nevertheless, the large range of putative T6SS effectors in CFBP13503 reinforces the interest in *S. rhizophila* antimicrobial activities.

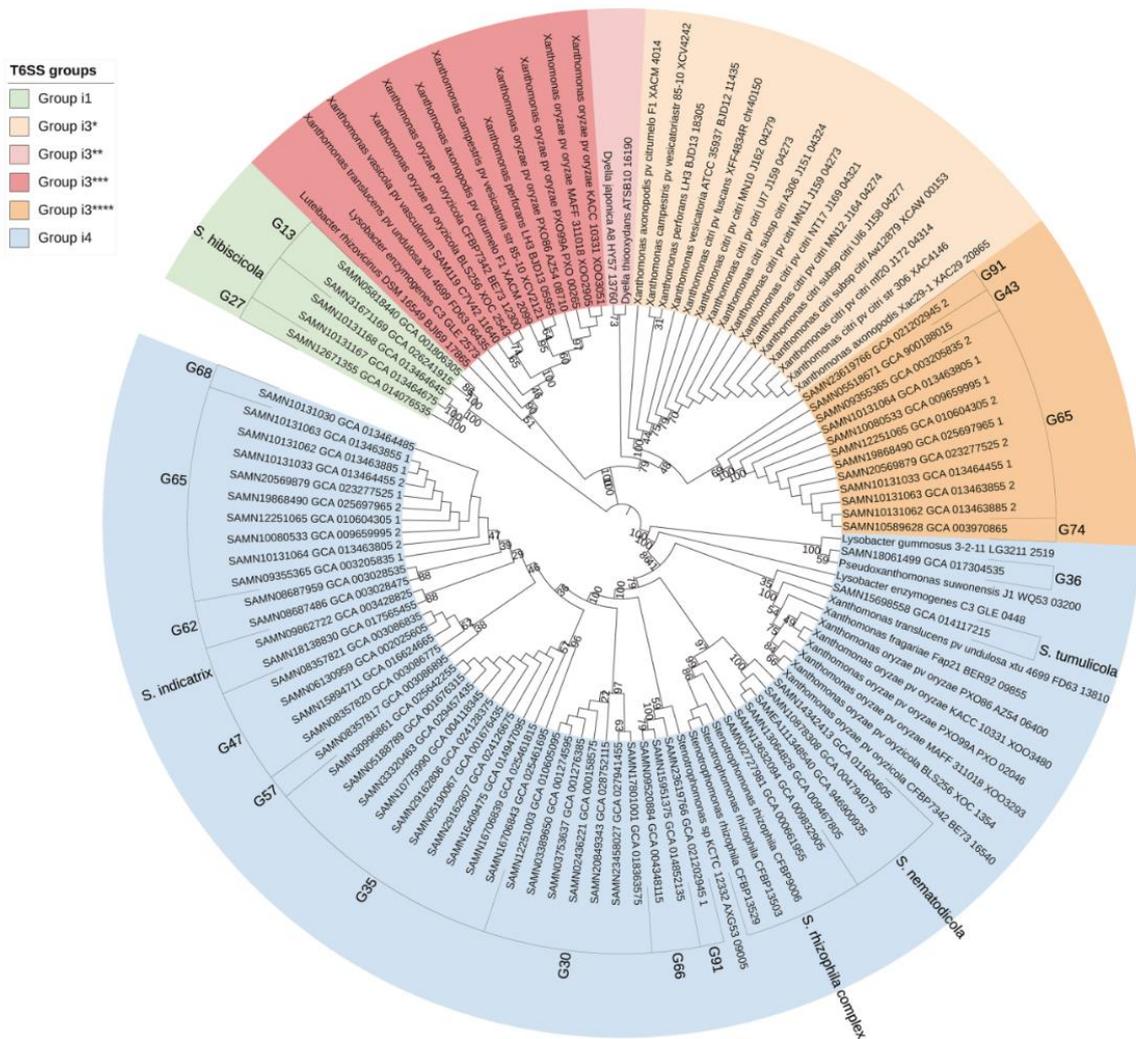


FIGURE 6 Type VI secretion system (T6SS) distribution among *Lyso bacteraceae*. Phylogenetic tree based on TssC protein sequences, constructed using a Kimura two-parameter neighbour-joining method with 1000 bootstrap replicates. The tree includes *Stenotrophomonas* and other *Lyso bacteraceae*, as studied by Bayer-Santos et al. (2019). Strain taxonomic affiliation is based on KI-5 grouping (Figure S1).

The T6SS of *S. rhizophila* CFBP13503 plays a crucial role in its antibiosis against *Xcc8004* and in limiting *Xcc8004* transmission from radish seed to seedling, highlighting its potential in biocontrol of seedborne pathogenic bacteria. The T6SS has emerged as a powerful tool in biocontrol strategies, offering a novel approach to combat plant pathogens. However, further research is necessary to fully understand its impact within complex microbial ecosystems. By investigating the role of the T6SS in diverse bacterial communities, valuable insights can be gained regarding its functionality, interactions with other microorganisms and ecological consequences. Understanding the influence of the T6SS on complex bacterial communities is essential for unlocking its full potential and maximizing its contribution to biocontrol approaches.

4 | EXPERIMENTAL PROCEDURES

4.1 | Bacterial strains and growth conditions

Bacterial strains and plasmids used in this study are listed in Table S1. *S. rhizophila* CFBP13503 and *Xcc8004*::GUS-GFP (Cerutti et al., 2017) were grown at 28°C on tryptic soy agar 1/10× strength (TSA10; 17g/L tryptone, 3g/L soybean peptone, 2.5g/L glucose, 5g/L NaCl, 5g/L K₂HPO₄, 15g/L agar) or tryptic soy broth 1/10× strength (TSB10). *Escherichia coli* DH5α and *E. coli* MFDpir (Ferrières et al., 2010) were grown at 37°C on Luria-Bertani (LB; 10g/L tryptone, 5g/L yeast extract, 10g/L NaCl) medium. LB medium was supplemented with 0.3mM 2,5-diaminopimelic acid (Fisher Scientific) for auxotrophic *E. coli* MFDpir.

4.2 | Construction of *S. rhizophila* CFBP13503 Δ *hcp* and CFBP13503 Δ *tssB* and their complementation

Unmarked *hcp* (HKJBHOBG_02305) and *tssB* (HKJBHOBG_02307) deletions were performed by allelic exchange using the suicide vector pEX18Tc (Hoang et al., 1998). The deletion plasmids pEX18Tc- Δ *hcp* and pEX18Tc- Δ *tssB* were constructed using the TEDA cloning procedure (Xia et al., 2019). Briefly, pEX18Tc was digested with XbaI (New England Biolabs) followed by a dephosphorylation step using the shrimp alkaline phosphatase (Phusion High-Fidelity DNA polymerase; New England Biolabs). *hcp* and *tssB* flanking regions were PCR-amplified from CFBP13503 with the Phusion High-Fidelity DNA polymerase, and the primer pairs listed in Table S2. The dephosphorylated pEX18Tc vector and PCR products were purified using the NucleoSpin Gel and PCR Clean-up kit (Macherey-Nagel). TEDA reaction was then carried out by mixing 150 ng of pEX18Tc with the corresponding PCR products at a molar ratio of 1:4. One hundred microlitres of *E. coli* DH5 α were transformed with 5 μ L of TEDA reaction using the Inoue transformation procedure (Sambrook & Russell, 2006) modified by Xia et al. (2019). Amplicon insertions were validated by colony PCR with the primer pair M13F/M13R. Plasmids (pEX18Tc- Δ *hcp*) were extracted with the NucleoSpin plasmid kit (Macherey-Nagel), and insertion regions were verified by sequencing (Azenta Life Sciences). *E. coli* MFDpir was transformed with pEX18Tc- Δ *hcp* and pEX18Tc- Δ *tssB* using the modified Inoue method. Plasmids were transferred to *S. rhizophila* CFBP13503 by conjugation. *S. rhizophila* CFBP13503 transconjugants were selected on TSA10 supplemented with tetracycline (20 μ g/mL). The resulting colonies were grown in TSB10 (28°C, 120 rpm, 3 h) and bacterial suspensions were spread on TSA10 supplemented with 5% saccharose. Allelic exchanges were validated by PCR and sequencing.

Deletion mutants were complemented by allele exchange. Briefly, *hcp* and *tssB* were PCR-amplified with the primer pairs Hcp-pEX18-UpF/Hcp-pEX18-DnR and TssB-pEX18-UcpF/TssB-pEX18-DnR (Table S2). TEDA reactions were performed at a vector:insert molar ratio of 1:1. pEX18Tc-*hcp* and pEX18Tc-*tssB* were transferred by electroporation to CFBP13503 Δ *hcp* and CFBP13503 Δ *tssB*, respectively. To carry out this electroporation step, bacteria were grown in TSA to OD₆₀₀ of 0.5–0.7. Bacterial cultures were centrifuged (4100g, 10 min, 2°C), and pellets were washed four times in cold sterile water, once in 10% glycerol and finally resuspended in 10% glucose before storage at –80°C. CFBP13503 Δ *hcp* and CFBP13503 Δ *tssB* were transformed with 150 ng of pEX18Tc-*hcp* and pEX18Tc-*tssB* (2 kV, 5 ms). Transformants were selected on TSA10 supplemented with tetracycline (20 μ g/mL). The resulting colonies were grown in TSB10 (28°C, 120 rpm, 3 h), and bacterial suspensions were spread on TSA10 supplemented with 5% saccharose. Allelic exchanges were validated by PCR and sequencing.

4.3 | In vitro confrontation assays

S. rhizophila CFBP13503, the isogenic T6SS-deficient mutants, the complemented T6SS mutants and Xcc8004-Rif^R were cultured overnight in 10 mL of TSB10 (28°C, 150 rpm). Cultures were centrifuged (4000g, 8 min, 20°C), and the resulting pellets were resuspended in sterile water. Bacterial suspensions were calibrated to OD₆₀₀ of 0.5 (c. 10⁹ cells/mL). For confrontation on a solid medium, calibrated suspensions were mixed at a ratio of 1:1 (i.e., 100 μ L of each strain). Single suspensions were prepared as a control by mixing 100 μ L of bacterial cultures with 100 μ L of sterile water. Drops of 20 μ L were deposited on TSA10, dried for 15 min under a laminar air flow and incubated at 28°C for 6 and 24 h. At each incubation time, cells were resuspended in 2.5 mL of sterile water, serially diluted and plated on TSA10 supplemented with 50 μ g/mL rifampicin (selection of Xcc8004-Rif^R) or with 50 μ g/mL spectinomycin and 100 μ g/mL ampicillin (selection of *S. rhizophila* strains). For confrontation in liquid medium, calibrated suspensions were mixed at a ratio of 1:1 (i.e., 500 μ L of each strain in 9 mL TSB10). As a control, single-strain suspensions were prepared by mixing 500 μ L of bacterial cultures with 500 μ L of TSB10. The confrontations were incubated at 28°C 150 rpm for 6 and 24 h. At each incubation time, confrontations were serially diluted and plated on TSA10 supplemented with 50 μ g/mL rifampicin (selection of Xcc8004-Rif^R) or with 50 μ g/mL spectinomycin and 100 μ g/mL ampicillin (selection of *S. rhizophila* strains).

4.4 | In planta transmission assays

Three subsamples of 300 radish seeds (*Raphanus sativus* 'Flamboyant 5') were surface sterilized using the protocol described in Simonin et al. (2023). Sterilized seeds were dried 30 min before inoculation in a laminar flow cabinet. Bacterial suspensions were prepared at an OD₆₀₀ of 0.5 from 24-h bacterial mats on TSA10. These suspensions corresponded to (i) Xcc8004, (ii) Xcc8004/CFBP13503 (1:1 ratio) and (iii) Xcc8004/CFBP13503 Δ *hcp* (1:1 ratio). Seeds were either soaked into bacterial suspensions (15 min, 20°C, 70 rpm) or sterile water (noninoculated condition). Seeds were dried for 15 min on sterile paper under a laminar air flow. Inoculated and noninoculated seeds were placed on sterile folded moistened papers in sterile plastic boxes. Three repetitions (20 seeds per repetition) were carried out per condition. Boxes were incubated in a growth chamber (photoperiod: 16 h/8 h, temperature 20°C). Germinated seeds were collected 24-h post-inoculation ($n=3$, 20 germinated seeds per repetition). Seedlings were harvested 5 days post-inoculation ($n=3$, 20 seedlings per repetition). The same experiment was repeated with $n=4$ repetitions. Bacterial population sizes were assessed by dilution and plating on TSA10 supplemented with appropriate antibiotics (see in vitro confrontation assays). Seed-associated bacteria were recovered 15 min after inoculation (initial time) by vortexing

20 seed pools in 2 mL of sterile water for 30 s. Germinated seeds (20 seedling pools) were ground in 4 mL of sterile water. The entire aerial and root parts of seedlings (20 seedling pools) including both endophytic and epiphytic bacteria were separated and ground in 4 mL of sterile water. No bacterial growth was observed on the selective media for the noninoculated seeds, germinated seeds and seedlings attesting the absence of culturable bacteria in the control.

4.5 | Genomic analysis of *S. rhizophila* CFBP13503 T6SS and effector prediction

The genomic sequence of *S. rhizophila* CFBP13503 (SAMN09062466) was initially obtained through paired-end Illumina sequencing (Torres-Cortés et al., 2019). To circularize the genomic sequence of CFBP13503, PacBio sequencing was performed on an RS2 machine (Genotoul). PacBio reads were filtered and demultiplexed using the ccs v. 6.3.0 and lima v. 2.5.1 tools of the PacBio SMRT Tools v. 11.0.0.146107 toolkit and then assembled and circularized using Flye v. 2.9 (Kolmogorov et al., 2019). The sequence start was fixed using the fixstart option of Circlator v. 1.5.1 (Hunt et al., 2015). Polishing with PacBio reads was performed using Flye v. 2.9 (Kolmogorov et al., 2019). Polishing with Illumina HiSeq3000 short reads was done using Pilon v. 1.24 (Walker et al., 2014) with the setting --mindepth 0. Genome annotation was performed with Prokka v. 1.14.6 (Seemann, 2014).

The T6SS components were identified by conducting NCBI BLASTP analysis on protein sequences. Effector-immunity encoding gene pairs and chaperones were identified by analysing genes downstream of *vgrG* and PAAR motif-containing genes. The conserved domain database of the NCBI was used to identify T6SS-related conserved domains. Structural homology-based searches were made using AlphaFold2 (Jumper et al., 2021) structure prediction of putative effectors followed by a DALI (Holm et al., 2023) search analysis or using the Foldseek search server (van Kempen et al., 2023).

4.6 | Phylogenetic analysis of T6SS

A total of 991 genome sequences of *Stenotrophomonas* were downloaded from the NCBI. Genomes with fewer than 10 markers (Marker_lineage=f_Xanthomonadaceae) absent or in multicopy (CheckM v. 1.1.6; Parks et al., 2015) were conserved for further analysis. A multilocus species tree was created with AutomlSt (Alanjary et al., 2019). Non-*Stenotrophomonas*-affiliated genomes were excluded from further analyses, resulting in a final dataset comprising 835 *Stenotrophomonas* genomes. Sequence relatedness between the selected 835 genomes sequences was assessed with KI-S (Briand et al., 2021) using 50% of shared 15-mers, a proxy for delineating bacterial species. Genome sequences were annotated with Prokka v. 1.14.6 (Seemann, 2014). The presence of T6SS genomic clusters was predicted with MacSyFinder2 (Néron et al., 2023). TssC protein sequences were retrieved following BLASTP searches using

TssC sequences of *S. rhizophila* CFBP13503 (iT6SS group 4b) and *Stenotrophomonas* sp. LM091 (iT6SS group 1). BLASTP hits with >25% identity over 75% of protein length were conserved. TssC sequences were aligned using MUSCLE. A Kimura two-parameter neighbour-joining tree was constructed with 1000 bootstraps with SeaView v. 4.7 (Gouy et al., 2010). The T6SS groups have been assigned according to the previously defined nomenclatures (Bayer-Santos et al., 2019; Bernal et al., 2017; Gallegos-Monterrosa & Coulthurst, 2021).

ACKNOWLEDGEMENTS

This work was funded by the TypeSEEDS project (INRAE: Plant Health and Environment division, HoloFlux Metaprogram) and the Region des Pays de la Loire (RFI "Objectif Végétal"). We thank the CIRM-CFBP for providing access to strains of their culture collection.

CONFLICT OF INTEREST STATEMENT

The authors declare that they have no conflicts of interest.

DATA AVAILABILITY STATEMENT

Sequence data generated during this work can be found in the GenBank database. The coding sequence of CFBP13503 has been deposited in GenBank at www.ncbi.nlm.nih.gov with accession number CP128598.

ORCID

Alain Sarniguet  <https://orcid.org/0000-0001-6232-0200>

REFERENCES

- Alanjary, M., Steinke, K. & Ziemert, N. (2019) AutoMLST: an automated web server for generating multi-locus species trees highlighting natural product potential. *Nucleic Acids Research*, 47, W276–W282.
- Alavi, P., Starcher, M., Zachow, C., Mueller, H. & Berg, G. (2013) Root-microbe systems: the effect and mode of interaction of stress protecting agent (SPA) *Stenotrophomonas rhizophila* DSM14405^T. *Frontiers in Plant Science*, 4, 141.
- Baker, K.F. & Smith, S.H. (1966) Dynamics of seed transmission of plant pathogens. *Annual Review of Phytopathology*, 4, 311–332.
- Barret, M., Guimbaud, J., Darrasse, A. & Jacques, M. (2016) Plant microbiota affects seed transmission of phytopathogenic microorganisms. *Molecular Plant Pathology*, 17, 791–795.
- Bayer-Santos, E., de Moraes Ceseti, L., Farah, C.S. & Alvarez-Martinez, C.E. (2019) Distribution, function and regulation of type 6 secretion systems of *Xanthomonadales*. *Frontiers in Microbiology*, 10, 1635.
- Berg, G. & Ballin, G. (1994) Bacterial antagonists to *Verticillium dahliae* Kleb. *Journal of Phytopathology*, 141, 99–110.
- Berg, G., Marten, P. & Ballin, G. (1996) *Stenotrophomonas maltophilia* in the rhizosphere of oilseed rape—occurrence, characterization and interaction with phytopathogenic fungi. *Microbiological Research*, 151, 19–27.
- Bernal, P., Allsopp, L.P., Filloux, A. & Llamas, M.A. (2017) The *Pseudomonas putida* T6SS is a plant warden against phytopathogens. *The ISME Journal*, 11, 972–987.
- Bernal, P., Llamas, M.A. & Filloux, A. (2018) Type VI secretion systems in plant-associated bacteria. *Environmental Microbiology*, 20, 1–15.

- Berni, B., Soscia, C., Djermoun, S., Ize, B. & Bleves, S. (2019) A type VI secretion system trans-kingdom effector is required for the delivery of a novel antibacterial toxin in *Pseudomonas aeruginosa*. *Frontiers in Microbiology*, 10, 1218.
- Briand, M., Bouzid, M., Hunault, G., Legeay, M., Fischer-Le Saux, M. & Barret, M. (2021) A rapid and simple method for assessing and representing genome sequence relatedness. *Peer Community Journal*, 1, e24.
- Cassan, F.D., Coniglio, A., Amavizca, E., Maroniche, G., Cascales, E., Bashan, Y. et al. (2021) The *Azospirillum brasilense* type VI secretion system promotes cell aggregation, biocontrol protection against phytopathogens and attachment to the microalgae *Chlorella sorokiniana*. *Environmental Microbiology*, 23, 6257–6274.
- Cerutti, A., Jauneau, A., Auriac, M.-C., Lauber, E., Martinez, Y., Chiarenza, S. et al. (2017) Immunity at cauliflower hydathodes controls systemic infection by *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*. *Plant Physiology*, 174, 700–716.
- Chen, W.-J., Kuo, T.-Y., Hsieh, F.-C., Chen, P.-Y., Wang, C.-S., Shih, Y.-L. et al. (2016) Involvement of type VI secretion system in secretion of iron chelator pyoverdine in *Pseudomonas taiwanensis*. *Scientific Reports*, 6, 32950.
- Cherrak, Y., Flaugnatti, N., Durand, E., Journet, L. & Cascales, E. (2019) Structure and activity of the type VI secretion system. *Microbiology Spectrum*, 7. Available from: <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.PSIB-0031-2019>
- Chesneau, G., Laroche, B., Prévieux, A., Marais, C., Briand, M., Marolleau, B. et al. (2022) Single seed microbiota: assembly and transmission from parent plant to seedling. *mBio*, 13, e01648-22.
- Choi, Y., Kim, N., Mannaa, M., Kim, H., Park, J., Jung, H. et al. (2020) Characterization of type VI secretion system in *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* and its role in virulence to rice. *The Plant Pathology Journal*, 36, 289–296.
- Cianfanelli, F.R., Diniz, J.A., Guo, M., Cesare, V.D., Trost, M. & Coulthurst, S.J. (2016) VgrG and PAAR proteins define distinct versions of a functional type VI secretion system. *PLoS Pathogens*, 12, e1005735.
- Darrasse, A., Darsonval, A., Boureau, T., Brisset, M.-N., Durand, K. & Jacques, M.-A. (2010) Transmission of plant-pathogenic bacteria by nonhost seeds without induction of an associated defense reaction at emergence. *Applied and Environmental Microbiology*, 76, 6787–6796.
- Decoin, V., Barbey, C., Bergeau, D., Latour, X., Feuilloley, M.G., Orange, N. et al. (2014) A type VI secretion system is involved in *Pseudomonas fluorescens* bacterial competition. *PLoS One*, 9, e89411.
- Denancé, N. & Grimault, V. (2022) Seed pathway for pest dissemination: the ISTA reference pest list, a bibliographic resource in non-vegetable crops. *EPPO Bulletin*, 52, 434–445.
- Egamberdieva, D., Kucharova, Z., Davranov, K., Berg, G., Makarova, N., Azarova, T. et al. (2011) Bacteria able to control foot and root rot and to promote growth of cucumber in salinated soils. *Biology and Fertility of Soils*, 47, 197–205.
- Engering, A., Hogerwerf, L. & Slingenbergh, J. (2013) Pathogen–host–environment interplay and disease emergence. *Emerging Microbes & Infections*, 2, e5.
- Fei, N., Ji, W., Yang, L., Yu, C., Qiao, P., Yan, J. et al. (2022) Hcp of the type VI secretion system (T6SS) in *Acidovorax citrulli* group II strain Aac5 has a dual role as a core structural protein and an effector protein in colonization, growth ability, competition, biofilm formation, and ferric iron absorption. *International Journal of Molecular Sciences*, 23, 9632.
- Ferrières, L., Hémerly, G., Nham, T., Guérou, A.-M., Mazel, D., Beloin, C. et al. (2010) Silent mischief: bacteriophage mu insertions contaminate products of *Escherichia coli* random mutagenesis performed using suicidal transposon delivery plasmids mobilized by broad-host-range RP4 conjugative machinery. *Journal of Bacteriology*, 192, 6418–6427.
- Flaugnatti, N., Le, T.T.H., Cnaan, S., Aschtgen, M.-S., Nguyen, V.S., Blangy, S. et al. (2016) A phospholipase A1 antibacterial type VI secretion effector interacts directly with the C-terminal domain of the VgrG spike protein for delivery. *Molecular Microbiology*, 99, 1099–1118.
- Flaugnatti, N., Rapisarda, C., Rey, M., Beauvois, S.G., Nguyen, V.A., Cnaan, S. et al. (2020) Structural basis for loading and inhibition of a bacterial T6SS phospholipase effector by the VgrG spike. *The EMBO Journal*, 39, e104129.
- Gallegos-Monterrosa, R. & Coulthurst, S.J. (2021) The ecological impact of a bacterial weapon: microbial interactions and the type VI secretion system. *FEMS Microbiology Reviews*, 45, fuab033.
- Gouy, M., Guindon, S. & Gascuel, O. (2010) SeaView version 4: a multiplatform graphical user interface for sequence alignment and phylogenetic tree building. *Molecular Biology and Evolution*, 27, 221–224.
- Granato, E.T., Meiller-Legrand, T.A. & Foster, K.R. (2019) The evolution and ecology of bacterial warfare. *Current Biology*, 29, R521–R537.
- Gröschel, M.I., Meehan, C.J., Barilar, I., Diricks, M., Gonzaga, A., Steglich, M. et al. (2020) The phylogenetic landscape and nosocomial spread of the multidrug-resistant opportunist *Stenotrophomonas maltophilia*. *Nature Communications*, 11, 2044.
- Hersch, S.J., Manera, K. & Dong, T.G. (2020) Defending against the type six secretion system: beyond immunity genes. *Cell Reports*, 33, 10–13.
- Ho, B.T., Dong, T.G. & Mekalanos, J.J. (2014) A view to kill: the bacterial type VI secretion system. *Cell, Host & Microbe*, 15, 9–21.
- Hoang, T.T., Karkhoff-Schweizer, R.R., Kutchma, A.J. & Schweizer, H.P. (1998) A broad-host-range Flp-FRT recombination system for site-specific excision of chromosomally-located DNA sequences: application for isolation of unmarked *Pseudomonas aeruginosa* mutants. *Gene*, 212, 77–86.
- Holm, L., Laiho, A., Törönen, P. & Salgado, M. (2023) DALI shines a light on remote homologs: one hundred discoveries. *Protein Science*, 32, e4519.
- Hunt, M., Silva, N.D., Otto, T.D., Parkhill, J., Keane, J.A. & Harris, S.R. (2015) Circlator: automated circularization of genome assemblies using long sequencing reads. *Genome Biology*, 16, 294.
- Jacques, M.-A., Arlat, M., Boulanger, A., Boureau, T., Carrère, S., Cesbron, S. et al. (2016) Using ecology, physiology, and genomics to understand host specificity in *Xanthomonas*. *Annual Review of Phytopathology*, 54, 163–187.
- Jiang, F., Wang, X., Wang, B., Chen, L., Zhao, Z., Waterfield, N.R. et al. (2016) The *Pseudomonas aeruginosa* type VI secretion PGAP1-like effector induces host autophagy by activating endoplasmic reticulum stress. *Cell Reports*, 16, 1502–1509.
- Jiang, F., Waterfield, N.R., Yang, J., Yang, G. & Jin, Q. (2014) A *Pseudomonas aeruginosa* type VI secretion phospholipase D effector targets both procaryotic and eukaryotic cells. *Cell, Host & Microbe*, 15, 600–610.
- Jumper, J., Evans, R., Pritzel, A., Green, T., Figurnov, M., Ronneberger, O. et al. (2021) Highly accurate protein structure prediction with AlphaFold. *Nature*, 596, 583–589.
- Juréas, D. & Journet, L. (2021) Activity, delivery, and diversity of type VI secretion effectors. *Molecular Microbiology*, 115, 383–394.
- Kolmogorov, M., Yuan, J., Lin, Y. & Pevzner, P.A. (2019) Assembly of long, error-prone reads using repeat graphs. *Nature Biotechnology*, 37, 540–546.
- LaCourse, K.D., Peterson, S.B., Kulasekara, H.D., Radey, M.C., Kim, J. & Mougous, J.D. (2018) Conditional toxicity and synergy drive diversity among antibacterial effectors. *Nature Microbiology*, 3, 440–446.
- Lien, Y.-W. & Lai, E.-M. (2017) Type VI secretion effectors: methodologies and biology. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 7, 254.

- Lin, J., Zhang, W., Cheng, J., Yang, X., Zhu, K., Wang, Y. et al. (2017) A *Pseudomonas* T6SS effector recruits PQS-containing outer membrane vesicles for iron acquisition. *Nature Communications*, 8, 14888.
- Lin, J.-S., Pissaridou, P., Wu, H.-H., Tsai, M.-D., Filloux, A. & Lai, E.-M. (2018) TagF-mediated repression of bacterial type VI secretion systems involves a direct interaction with the cytoplasmic protein Fha. *Journal of Biological Chemistry*, 293, 8829–8842.
- Lin, L., Capozzoli, R., Ferrand, A., Plum, M., Vettiger, A. & Basler, M. (2022) Subcellular localization of type VI secretion system assembly in response to cell-cell contact. *EMBO Journal*, 41, e108595.
- Liu, Y., Gao, J., Wang, N., Li, X., Fang, N. & Zhuang, X. (2022) Diffusible signal factor enhances the saline-alkaline resistance and rhizosphere colonization of *Stenotrophomonas rhizophila* by coordinating optimal metabolism. *Science of the Total Environment*, 834, 155403.
- Liyanapathirana, P., Jones, J.B. & Potnis, N. (2021) A mutation of a single core gene, *tssM*, of type VI secretion system of *Xanthomonas perforans* influences virulence, epiphytic survival and transmission during pathogenesis on tomato. *Phytopathology*, 112, 752–764.
- Lopez, J., Le, N.H., Moon, K.H., Salomon, D., Bosis, E. & Feldman, M.F. (2021) Formylglycine-generating enzyme-like proteins constitute a novel family of widespread type VI secretion system immunity proteins. *Journal of Bacteriology*, 203, e00281-21.
- Lottmann, J., Heuer, H., Smalla, K. & Berg, G. (1999) Influence of transgenic T4-lysozyme-producing potato plants on potentially beneficial plant-associated bacteria. *FEMS Microbiology Ecology*, 29, 365–377.
- Luo, J., Chu, X., Jie, J., Sun, Y., Guan, Q., Li, D. et al. (2023) *Acinetobacter baumannii* kills fungi via a type VI DNase effector. *mBio*, 14, e03420-22.
- Ma, L.-S., Hachani, A., Lin, J.-S., Filloux, A. & Lai, E.-M. (2014) *Agrobacterium tumefaciens* deploys a superfamily of type VI secretion DNase effectors as weapons for interbacterial competition in planta. *Cell, Host & Microbe*, 16, 94–104.
- Minkwitz, A. & Berg, G. (2001) Comparison of antifungal activities and 16S ribosomal DNA sequences of clinical and environmental isolates of *Stenotrophomonas maltophilia*. *Journal of Clinical Microbiology*, 39, 139–145.
- Miyata, S.T., Unterweger, D., Rudko, S.P. & Pukatzki, S. (2013) Dual expression profile of type VI secretion system immunity genes protects pandemic *Vibrio cholerae*. *PLoS Pathogens*, 9, e1003752.
- Montenegro Benavides, N.A., Alvarez, B.A., Arrieta-Ortiz, M.L., Rodriguez-R, L.M., Botero, D., Tabima, J.F. et al. (2021) The type VI secretion system of *Xanthomonas phaseoli* pv. *manihotis* is involved in virulence and in vitro motility. *BMC Microbiology*, 21, 14.
- Mosquito, S., Bertani, I., Licastro, D., Compant, S., Myers, M.P., Hinarejos, E. et al. (2019) In planta colonization and role of T6SS in two rice *Kosakonia* endophytes. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 33, 349–363.
- Néron, B., Denise, R., Coluzzi, C., Touchon, M., Rocha, E.P.C. & Abby, S.S. (2023) MacSyFinder v2: improved modelling and search engine to identify molecular systems in genomes. *Peer Community Journal*, 3, e28.
- Newcombe, G., Harding, A., Ridout, M. & Busby, P.E. (2018) A hypothetical bottleneck in the plant microbiome. *Frontiers in Microbiology*, 9, 1645.
- Parks, D.H., Imelfort, M., Skennerton, C.T., Hugenholtz, P. & Tyson, G.W. (2015) CheckM: assessing the quality of microbial genomes recovered from isolates, single cells, and metagenomes. *Genome Research*, 25, 1043–1055.
- Randhawa, P. (1984) Selective isolation of *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* from crucifer seeds. *Phytopathology*, 74, 268–272.
- Rezki, S., Campion, C., Iacomi-Vasilescu, B., Preveaux, A., Toualbia, Y., Bonneau, S. et al. (2016) Differences in stability of seed-associated microbial assemblages in response to invasion by phytopathogenic microorganisms. *PeerJ*, 4, e1923.
- Rezki, S., Campion, C., Simoneau, P., Jacques, M.-A., Shade, A. & Barret, M. (2018) Assembly of seed-associated microbial communities within and across successive plant generations. *Plant and Soil*, 422, 67–79.
- Russell, A.B., LeRoux, M., Hathazi, K., Agnello, D.M., Ishikawa, T., Wiggins, P.A. et al. (2013) Diverse type VI secretion phospholipases are functionally plastic antibacterial effectors. *Nature*, 496, 508–512.
- Sambrook, J. & Russell, D.W. (2006) The Inoue method for preparation and transformation of competent *E. coli*: “ultra-competent” cells. *Cold Spring Harbor Protocols*, 2006, pdb.prot3944.
- Schmidt, C.S., Alavi, M., Cardinale, M., Müller, H. & Berg, G. (2012) *Stenotrophomonas rhizophila* DSM14405T promotes plant growth probably by altering fungal communities in the rhizosphere. *Biology and Fertility of Soils*, 48, 947–960.
- Seemann, T. (2014) Prokka: rapid prokaryotic genome annotation. *Bioinformatics*, 30, 2068–2069.
- Shyntum, D.Y., Theron, J., Venter, S.N., Moleleki, L.N., Toth, I.K. & Coutinho, T.A. (2015) *Pantoea ananatis* utilizes a type VI secretion system for pathogenesis and bacterial competition. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 28, 420–431.
- Si, M., Zhao, C., Burkinshaw, B., Zhang, B., Wei, D., Wang, Y. et al. (2017) Manganese scavenging and oxidative stress response mediated by type VI secretion system in *Burkholderia thailandensis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 114, E2233–E2242.
- Simonin, M., Briand, M., Chesneau, G., Rochefort, A., Marais, C., Sarniguet, A. et al. (2022) Seed microbiota revealed by a large-scale meta-analysis including 50 plant species. *New Phytologist*, 234, 1448–1463.
- Simonin, M., Préveaux, A., Marais, C., Garin, T., Arnault, G., Sarniguet, A. et al. (2023) Transmission of synthetic seed bacterial communities to radish seedlings: impact on microbiota assembly and plant phenotype. *Peer Community Journal*, 3, e95.
- Storey, D., McNally, A., Åstrand, M., Santos, J., sa-Pessoa Graca Santos, J., Rodriguez-Escudero, I. et al. (2020) *Klebsiella pneumoniae* type VI secretion system-mediated microbial competition is PhoPQ controlled and reactive oxygen species dependent. *PLoS Pathogens*, 16, e1007969.
- Torres-Cortés, G., Garcia, B.J., Compant, S., Rezki, S., Jones, P., Préveaux, A. et al. (2019) Differences in resource use lead to co-existence of seed-transmitted microbial populations. *Scientific Reports*, 9, 6648.
- Trunk, K., Peltier, J., Liu, Y.-C., Dill, B.D., Walker, L., Gow, N.A.R. et al. (2018) The type VI secretion system deploys antifungal effectors against microbial competitors. *Nature Microbiology*, 3, 920–931.
- Unterweger, D., Kostiuik, B. & Pukatzki, S. (2017) Adaptor proteins of type VI secretion system effectors. *Trends in Microbiology*, 25, 8–10.
- van der Wolf, J., Kastelein, P., da Silva Júnior, T.A., Lelis, F.V. & van der Zouwen, P. (2019) Colonization of siliques and seeds of rapid cycling *Brassica oleracea* plants by *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* after spray-inoculation of flower clusters. *European Journal of Plant Pathology*, 154, 445–461.
- van Kempen, M., Kim, S.S., Tumescheit, C., Mirdita, M., Lee, J., Gilchrist, C.L.M. et al. (2023) Fast and accurate protein structure search with Foldseek. *Nature Biotechnology*. Available from: <https://doi.org/10.1038/s41587-023-01773-0>
- Vicente, J.G. & Holub, E.B. (2013) *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* (cause of black rot of crucifers) in the genomic era is still a worldwide threat to brassica crops. *Molecular Plant Pathology*, 14, 2–18.
- Walker, B.J., Abeel, T., Shea, T., Priest, M., Abouelliel, A., Sakthikumar, S. et al. (2014) Pilon: an integrated tool for comprehensive microbial

- variant detection and genome assembly improvement. *PLoS One*, 9, e112963.
- Weber, B.S., Hennon, S.W., Wright, M.S., Scott, N.E., de Berardinis, V., Foster, L.J. et al. (2016) Genetic dissection of the type VI secretion system in *Acinetobacter* and identification of a novel peptidoglycan hydrolase, Tagx, required for its biogenesis. *mBio*, 7, e01253-16.
- Wolf, A., Fritze, A., Hagemann, M. & Berg, G. (2002) *Stenotrophomonas rhizophila* sp. nov., a novel plant-associated bacterium with antifungal properties. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 52, 1937–1944.
- Xia, Y., Li, K., Li, J., Wang, T., Gu, L. & Xun, L. (2019) T5 exonuclease-dependent assembly offers a low-cost method for efficient cloning and site-directed mutagenesis. *Nucleic Acids Research*, 47, e15.
- Zhang, J., Guan, J., Wang, M., Li, G., Djordjevic, M., Tai, C. et al. (2022) SecReT6 update: a comprehensive resource of bacterial type VI secretion systems. *Science China Life Sciences*, 66, 626–634.

SUPPORTING INFORMATION

Additional supporting information can be found online in the Supporting Information section at the end of this article.

How to cite this article: Garin, T., Brin, C., Préveaux, A., Brault, A., Briand, M., Simonin, M. et al. (2024) The type VI secretion system of *Stenotrophomonas rhizophila* CFBP13503 limits the transmission of *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* 8004 from radish seeds to seedlings. *Molecular Plant Pathology*, 25, e13412. Available from: <https://doi.org/10.1111/mpp.13412>

SUPPLEMENTARY DATA

KI-S Circlepack

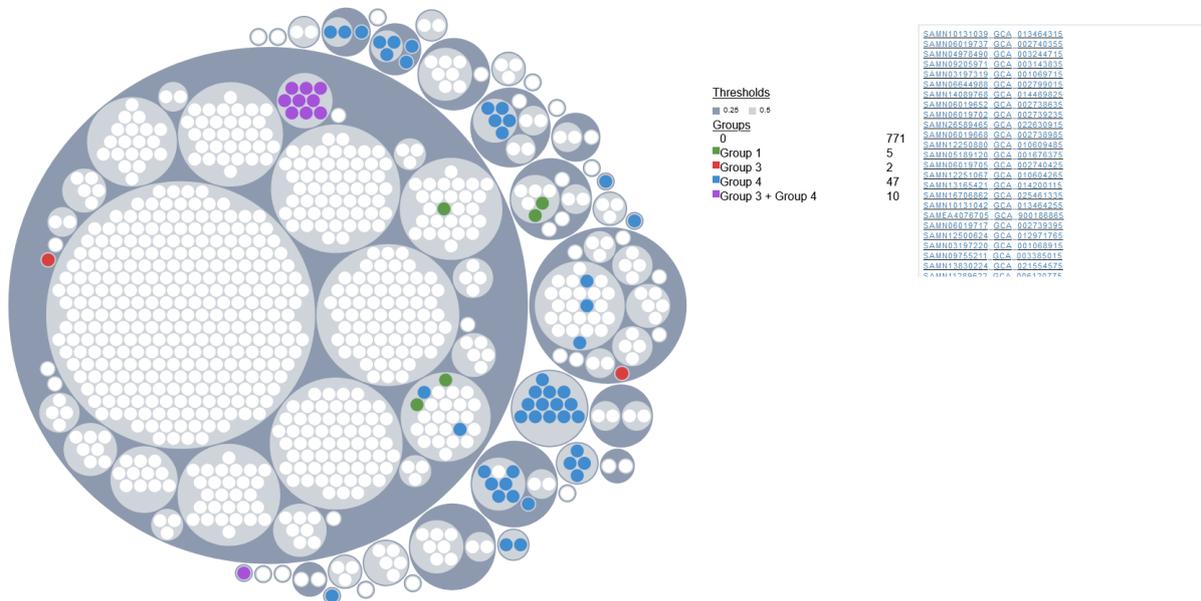


FIGURE S1. Type VI secretion system (T6SS) distribution among *Stenotrophomonas* sp. Interactive circle packing representation of *Stenotrophomonas* sp. genomes ($n=835$). Overall genome relatedness was assessed by comparing the percentage of shared 15-mers. Each dot represents a genome sequence, colour-coded based on the T6SS group. The genomes were grouped using two distinct thresholds to assess species-specific relationships (0.5) and interspecies relationships (0.25).

The interactive figure is available following the link : [Figure S1](#)

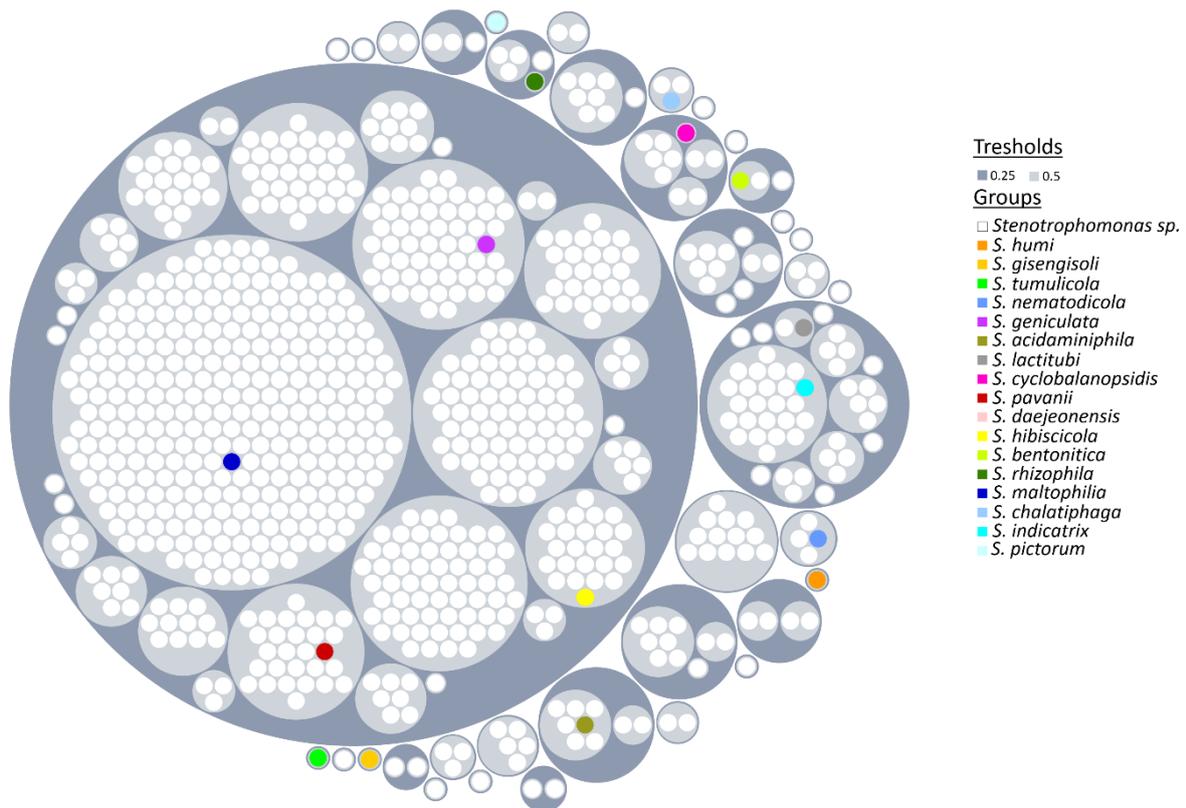


FIGURE S2. Clustering of *Stenotrophomonas* genome sequences. Circle packing representation of *Stenotrophomonas* sp. genomes ($n=835$). Overall genome relatedness was assessed by comparing the percentage of shared 15-mers. Each dot represents a genome sequence. The coloured dots represent the type strains of each described *Stenotrophomonas* species. The genomes were grouped using two distinct thresholds to assess species-specific relationships (0.5) and interspecies relationships (0.25).

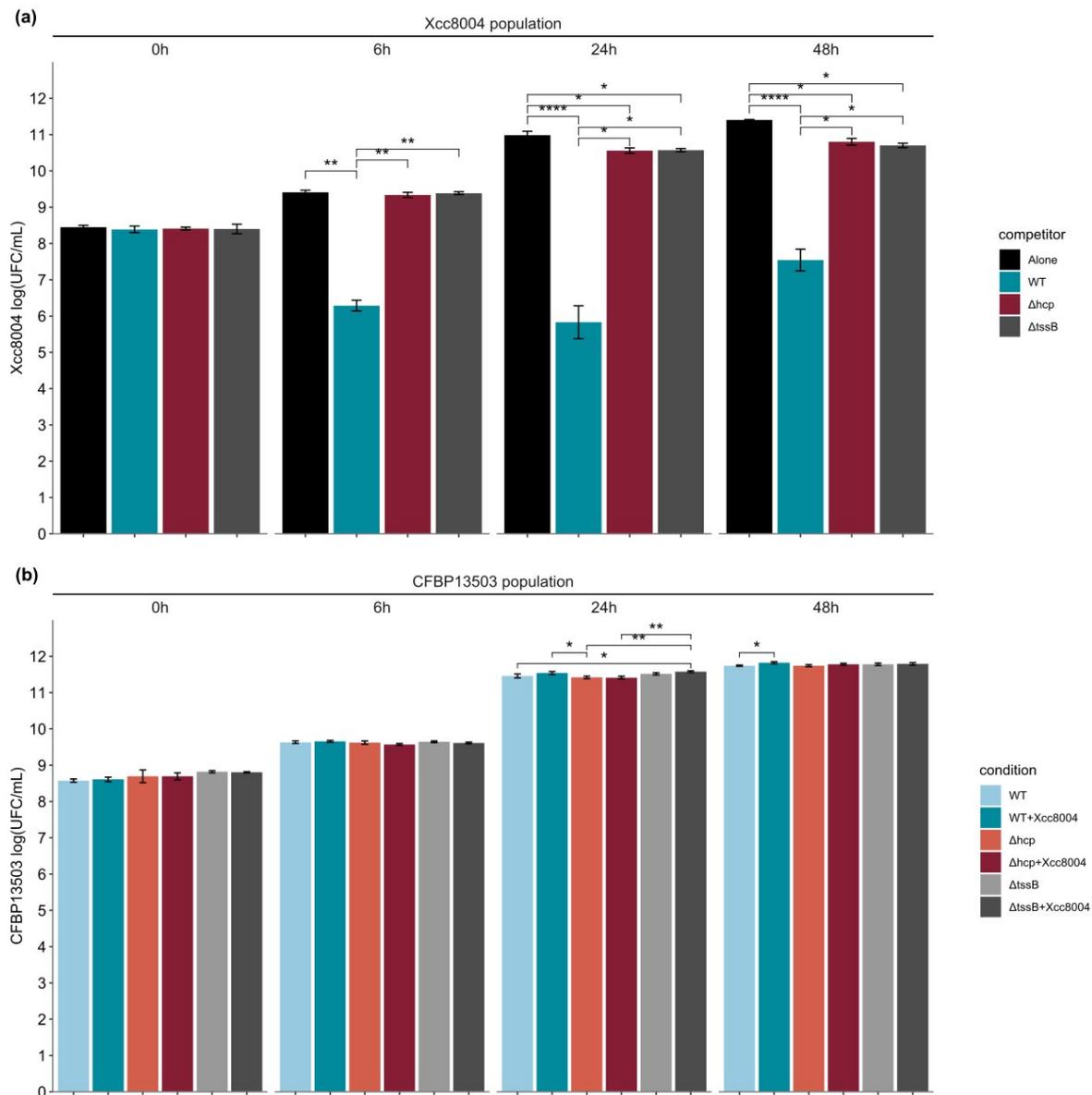


FIGURE S3. Dynamics of *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* (Xcc8004) and *Stenotrophomonas rhizophila* CFBP13503 populations in confrontation from 0 to 48h. Confrontation between Xcc8004 and (i) CFBP13503 wild-type, (ii) type VI secretion system (T6SS)-deficient mutants Δhcp (a) and $\Delta tssB$ (b) in TSA10 medium for 6, 24 and 48h. Colony-forming units (CFU) of Xcc8004 and CFBP13503 populations were quantified on TSA10 supplemented with rifampicin and ampicillin-streptomycin, respectively. The averages \pm SD of six replicates are plotted. Statistical analyses were performed using Dunn's multiple comparison test ($*p < 0.05$, $**p < 0.005$, $****p < 0.00005$).

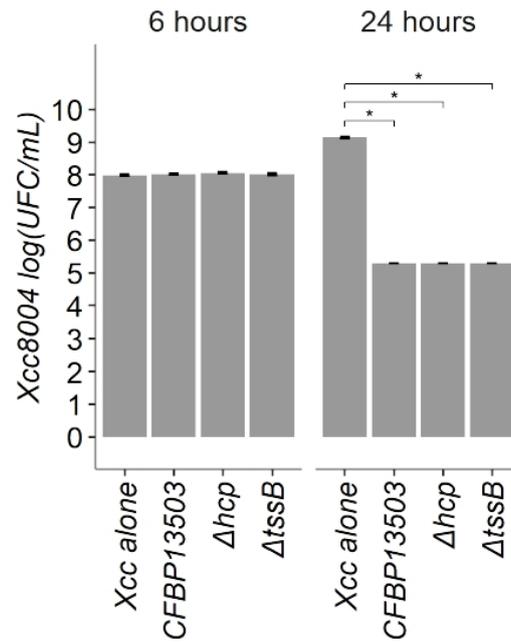


FIGURE S4. Bactericidal activity of *Stenotrophomonas rhizophila* CFBP13503 against *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* 8004 (Xcc8004) in liquid medium. Confrontation between Xcc8004 and *S* CFBP13503 wild-type, or type VI secretion system (T6SS)-deficient mutants (Δhcp and $\Delta tssB$) in TSB10 (liquid medium) for 6 and 24h. Colony-forming units (CFU) were quantified on TSA10 supplemented with rifampicin. The averages \pm SD of three replicates are plotted. Statistical analyses were performed using Dunn's multiple comparison test ($*p < 0.05$).

TABLE S1. Strains and plasmids used in this study.

Strain or plasmid	Description	Reference
Strains		
<i>E. coli</i>		
DH5 α	<i>F</i> - <i>endA1 glnV44 thi-1 recA1 relA1 gyrA96 deoR nupG purB20 ϕ80dlacZAM15 Δ(<i>lacZYA-argF</i>)U169, <i>hsdR17</i>(<i>rK-mK+</i>), λ-</i>	Sambrook et al. 1989
MFD <i>pir</i>	MG1655 <i>RP4-2-Tc::[ΔMu1::aac(3)IV-ΔaphA-Δnic35-ΔMu2::zeo] ΔdapA::(erm-<i>pir</i>) ΔrecA</i>	Ferrières et al. 2010
<i>S. rhizophila</i>		
CFBP13503	Wild type; <i>Spe</i> ^R <i>Amp</i> ^R	Rezki et al. 2016
CFBP13503 Δ <i>hcp</i>	CFBP13503 <i>hcp</i> deletion mutant	This study
CFBP13503 Δ <i>hcp</i> :: <i>hcp</i>	CFBP13503 <i>hcp</i> deletion mutant complemented	This study
<i>X. campestris</i> pv. <i>campestris</i>		
Xcc8004::GUS-GFP	Rif ^R ; GUS ⁺ GFP ⁺	Cerutti et al. 2017
Plasmids		
pEX18Tc	Tc ^R ; <i>oriT</i> ⁺ <i>sacB</i> ⁺ <i>lacZ</i> ⁺ , gene replacement vector with MCS from pUC18	Hoang et al. 1998
pEX18Tc- Δ <i>hcp</i>	pEX18Tc containing 500-pb sequences flanking <i>hcp</i>	This study
pEX18Tc- <i>hcp</i>	pEX18Tc carrying <i>hcp</i> and its regulatory regions	This study

TABLE S2. Primers used for type VI secretion system (T6SS) mutant constructions.

Name	Sequence
<i>hcp</i> -flanking regions	
Hcp-pEX18- UpF	5'-GCCTGCAGGTCGACTCTAGAGCTCATCGCGAAAAATCC-3'
Hcp- UpR -(DnF)	5'-GCTCGTGTGAATCTGTCGTACACGGTCGAGTTGCTG-3'
Hcp- DnF	5'-CGACAGATTCACACGAGC-3'
Hcp-pEX18- DnR	5'-GTACCCGGGGATCCTCTAGACGTTGGATCTCGCAGTAC-3'
<i>hcp</i> mutants validation	
Hcp-CDS-F	TCAAACGGCGTAGTTCGGAA
Hcp-CDS-R	CAGATATGCAGCACGCTTTCC
<i>hcp</i> mutant and complemented mutant sequencing	
hcp-312F	5'-CGTTCGTAATAGGGCAGCAGA-3'
hcp-981R	5'-GCCGTTTGATGTAGTGTCGC-3'
hcp-754F	5'-TTGAACACATGCCCTCCCC-3'
hcp-1568R	5'-TGCAGCGACGTTTTTCCAAG-3'
hcp-1405F	5'-ATCCTTGTGCTTGTGTCGTCGT-3'
hcp-2063R	5'-GGTTTCATTCCGCTGGTCCA-3'
<i>tssB</i> -flanking regions	
TssB-pEX18- UpF	5'-GCCTGCAGGTCGACTCTAGAGGTGGAGGTCTGCTGGCAC-3'
TssB- UpR -(DnF)	5'-TTCGTGGTGGGCGTGCAGATCGAACCGCTGC-3'
TssB- DnF	5'-CACGCCCACCAGAA-3'
TssB-pEX18- DnR	5'-GTACCCGGGGATCCTCTAGAGCCATCGTTGCCGCC-3'
<i>tssB</i> mutants validation	
TssB-UpF	GGTGGAGGTCTGCTGGCAC
TssB-DnR	GCCATCGTTGCCGCC
TssB-DelR	GGTCTATCGCGTCGCCAA
<i>tssB</i> mutant and complemented mutant sequencing	
tssB-2356F	GGCAGGCGACCCAGGAAG
tssB-3001F	TCGGACTTGGCGACCTTG
tssB-3630F	GTTACTGCGTGCGGATCA
tssB-3155R	AACAACACCGAACAGCTCAAG
tssB-3800R	GCCGTGCTTGAAGATCCCAA
tssB-4429R	AAGACAGTGTAAAAACGGCA

IV. Conclusions

Les T6SS sont sous-représentés au sein du genre *Stenotrophomonas*. Ces résultats sont en adéquation avec une étude parue parallèlement sur la distribution des T6SS au sein des *Stenotrophomonas* mais utilisant des méthodes d'analyse différentes (Crisan et al., 2023). Les bactéries de l'espèce *S. rhizophila* possèdent toutes un T6SS appartenant au groupe i4b qui semble donc conservé au sein de cette espèce. Cependant les génomes de cette espèce sont encore peu représentés dans les bases de données.

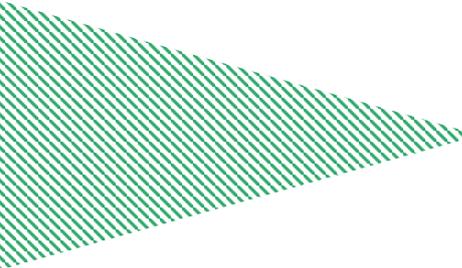
***S. rhizophila* CFBP13503 possède un cluster T6SS i4b associé à 9 effecteurs potentiels** : deux effecteurs de type lipase (Tle), un effecteur de type muramidase (Tae), un effecteur homologue à la toxine formant des pores VasX et deux effecteurs PAAR-Rhs-CT de type DNase (Tde). Les activités potentielles des trois derniers effecteurs n'ont pas pu être identifiées.

Le T6SS de *S. rhizophila* CFBP13503 est impliqué dans les compétitions inter-bactériennes. Il est ainsi impliqué dans l'antibiose par contact de Xcc8004 et **permet de limiter la transmission de l'agent phytopathogène de la graine de radis à la plantule.** Cette antibiose est détectée dès la germination des graines et son impact sur la population de Xcc8004 perdure au niveau des plantules. Les résultats des tests de transmission ont également permis de mettre en évidence l'expression, la production et l'utilisation du T6SS de *S. rhizophila* CFBP13503 *in planta*. En revanche, la présence d'un T6SS fonctionnel ne semble pas conférer d'avantage compétitif à *S. rhizophila* CFBP13503 qui ne voit pas sa population augmenter malgré l'antibiose envers Xcc8004.

Ces premiers résultats ont permis de répondre en partie à l'hypothèse : **les bactéries possédant un T6SS peuvent limiter la transmission d'agents phytopathogènes de la graine à la plantule.** Toutefois, il est à considérer que les tests de transmission ont été réalisés en conditions gnotobiotiques, en l'absence d'autres compétiteurs du microbiote de la graine et du microbiote du sol.

Compte tenu de la diversité des effecteurs associés au T6SS de *S. rhizophila* CFBP13503 et de son implication démontrée dans l'antibiose de Xcc8004, on peut alors se poser les questions suivantes :

- Est-ce que d'autres bactéries du microbiote des graines sont sensibles au T6SS de *S. rhizophila* CFBP13503 ?
- Est-ce que son activité antibactérienne peut impacter la dynamique de structuration de communautés bactériennes ?
- Quel est son impact sur la transmission du microbiote des graines et l'invasion des communautés telluriques lors de la transition graine-plantule ?
- Confère-t-il un avantage compétitif à *S. rhizophila* CFBP13503 lorsque celle-ci est confrontée à des communautés microbiennes complexes lors de sa transmission de la graine à la plantule ?



CHAPITRE 2

*Impact du T6SS sur la structuration de communautés
bactériennes synthétiques et sur leur dynamique de
transmission de la graine à la plantule*

I. Objectifs et stratégies

Ce deuxième chapitre aborde la question de l'impact du T6SS dans un contexte de communautés microbiennes dans le but de répondre à l'hypothèse que les compétitions microbiennes médiées par le T6SS pourraient impacter la structuration des communautés microbiennes associées aux graines et leur dynamique de transmission de la graine à la plantule.

Comme le microbiote des graines est très variable d'une graine à l'autre et que l'inoculation d'une souche bactérienne comme *S. rhizophila* CFBP13503 aurait un impact énorme sur l'équitabilité de la distribution des taxons au niveau des graines, la stratégie a été d'utiliser une approche de communautés bactériennes synthétiques (SynComs) composées exclusivement de bactéries isolées de graines afin d'obtenir une colonisation initiale moins variable entre les graines.

On sait que les T6SS sont très prévalents au niveau des bactéries associées aux plantes (Bernal et al., 2018). Toutefois, nous savons également que ces bactéries peuvent provenir à la fois des graines mais aussi de l'environnement. Est-ce que les T6SS sont prévalents chez les bactéries associées aux graines ? Cette question nous a amené au premier objectif de ce chapitre :

(1) Evaluer la distribution des T6SS au sein des bactéries associées aux graines.

Mieux comprendre les caractéristiques des bactéries associées aux graines permettrait de construire différentes SynComs en faisant varier le nombre de compétiteurs T6SS et la proximité phylogénétique entre les souches afin d'atteindre notre deuxième objectif :

(2) Evaluer l'impact des compétitions inter-bactériennes médiées par le T6SS de *S. rhizophila* CFBP13503 sur la structuration de communautés bactériennes synthétiques *in vitro*.

Pour répondre à cet objectif, différentes SynComs ont été construites et confrontées à la souche sauvage ou au mutant Δhcp de *S. rhizophila* CFBP13503. Les abondances relatives des souches bactériennes ont été évaluées par métabarcoding *gyrB*. Ce second objectif avait également pour but de déterminer le profil de sensibilité/résistance des bactéries au T6SS de *S. rhizophila* CFBP13503 en évaluant quelles souches étaient appauvries ou enrichies en

présence de la souche sauvage par rapport au mutant Δhcp . Ces profils nous ont permis de construire deux nouvelles SynComs afin de répondre à nos deux derniers objectifs :

- (3) Evaluer l'impact des compétitions inter-bactériennes médiées par le T6SS de *S. rhizophila* CFBP13503 sur la transmission du microbiote des graines et celui du sol à la plantule.**
- (4) Evaluer si les compétitions inter-bactériennes médiées par le T6SS confèrent un avantage compétitif à *S. rhizophila* CFBP13503 lors de sa transmission de la graine à la plantule lorsqu'elle est confrontée au microbiote des graines et à celui du sol.**

II. Contribution des auteurs

Dans ces travaux, j'ai réalisé la production des figures et la rédaction de l'article, conjointement avec Alain SARNIGUET et Matthieu BARRET. J'ai également mis au point et réalisé les expériences de confrontations en communautés synthétiques. Agathe BRAULT a obtenu les variants résistants à la rifampicine et nous avons conjointement effectué les tests de confrontation par paire. Anne PREVEAUX m'a aidé pour les tests de transmissions, de la mise en place du plan expérimental aux tests. Les banques d'amplicon ont été réalisées conjointement avec Coralie MARAIS et le plateau ANAN (SFR QuaSaV). Matthieu BARRET a participé aux analyses métabarcoding ainsi qu'aux analyses phylogénétiques. Finalement, Marie SIMONIN a apporté son expertise sur les tests en communautés synthétiques et le microbiote des graines. Elle a également construit la figure représentant l'abondance et la prévalence des ASVs *gyrB* des bactéries sélectionnées au niveau des échantillons de graines de radis et de colza. L'ensemble des auteurs a participé à la révision de cet article.

III. Résultats

T6SS-mediated competition by *Stenotrophomonas rhizophila* CFBP13503 shapes seed-borne bacterial communities and seed-to-seedling transmission dynamic

Tiffany Garin¹ | Agathe Brault¹ | Coralie Marais¹ | Martial Briand¹ | Anne Prévieux¹ | Marie Simonin¹ | Matthieu Barret¹ | Alain Sarniguet¹

¹ Univ Angers, Institut Agro, INRAE, IRHS, SFR QUASAV, F-49000 Angers, France

ABSTRACT

Aim: Seeds harbor diverse microbial communities important for plant growth and health. During germination, seed exudation triggers intense microbial competition, shaping the communities transmitted to seedlings. This study aims to explore the role of the bacterial type VI secretion system (T6SS)-mediated interference competition in seed microbiota transmission to seedlings.

Methods: The distribution of T6SS in seed-associated bacteria was assessed among 180 seed isolate genomes. We then focused on the radish seed-borne bacterium *Stenotrophomonas rhizophila* CFBP13503, which possesses one T6SS cluster involved in interbacterial competition. The wild-type strain and its isogenic T6SS-impaired mutant were compared in *in vitro* confrontation assays for their influence on the dynamics of 5 synthetic communities (SynComs) of seed-borne bacteria from 9 distinct families. Additionally, the impacts of T6SS on the dynamics of the bacterial communities during seed-to-seedling transmission were investigated by inoculating sterilized radish seeds, sown in soil, either with CFBP13503 alone (or its T6SS mutant) or in co-inoculation with 2 SynComs.

Results: T6SS is highly prevalent in seed-associated bacteria, with 61.7% possessing at least one T6SS. The significant impact of CFBP13503 T6SS on a range of SynCom dynamics in *in vitro* confrontations revealed a phylogenetic signal outlining a susceptible/resistant profile aligned with taxonomic and metabolic distances. The T6SS influence on the abundance of a few specific bacterial taxa during seed-to-seedling transmission depended on seed microbial initial inoculation and plant stage. Depending on the sensitivity of co-inoculated competitors, T6SS could provide a competitive advantage to CFBP13503, resulting in an increased population size. However, the T6SS of CFBP13503 was not the primary driver of community structuring when competing with soil microbiota.

Conclusion: The high prevalence of T6SS in seed-borne bacteria supports the importance of T6SS-mediated competition for seed microbiota assembly. *In vitro*, CFBP13503 T6SS exerts a strong impact on bacterial community dynamics. The susceptibility to T6SS increases with the phylogenetic and metabolic proximity of bacteria to CFBP13503, suggesting an influence of interspecies trophic patterns in T6SS-mediated competitions. *In planta* and soil, CFBP13503 T6SS influences specific bacterial taxa, leading to shifts in bacterial interactions and distinct community dynamics. T6SS-mediated competition plays a pivotal role in shaping seed bacterial communities and the dynamics of seed-to-seedling transitions.

1 | INTRODUCTION

Seeds serve as a vector for the dissemination of numerous plant-associated microorganisms (Simonin et al., 2022). While seeds are often considered the starting point for plant microbiota assembly (Shade et al., 2017), the percentage of seed-borne microorganisms successfully transmitted to seedlings is quite variable (Johnston-Monje et al., 2021; Kim et al., 2022; Rochefort et al., 2021; Yang et al., 2017). These variations in seedling transmission of seed-borne microbes may be attributed to competition with soil-borne taxa for seedling colonization (Walsh et al., 2021). This competition between microorganisms is the result of the exudation of numerous molecules during seed imbibition, which creates a specific habitat - the spermosphere (Nelson, 2004). Like other habitats (i.e. rhizosphere and phyllosphere), the nature and quantities of exudates is an important driver of microbial community composition (Olofintila and Noel, 2023). This is perhaps even more striking within the spermosphere since the plant defense responses appear to be not induced during germination (Darrasse et al., 2010; Ortega-Cuadros et al., 2022). Hence competition for resources between micro-organisms is probably a key factor for successful seedling colonization.

Microbial competition could be broadly divided into exploitative and interference competitions (Granato et al., 2019). The former is based on the rapid and efficient use of resources, a strategy used by copiotroph (Koch, 2001). High relative abundance of copiotrophic bacterial taxa have been reported in seedlings (Barret et al., 2015; Torres-Cortés et al., 2018) and spermospheres (Olofintila and Noel, 2023) of different plant species. These observations suggested that this life history strategy is important for seed to seedling transmission. In contrast to exploitative competition, interference competition relies on limiting the access of other microorganisms to resources through the production of antimicrobial compounds (Granato et al., 2019). Among the wide range of mechanisms used to inhibit microbial growth, contact-dependent mechanisms based on the Type VI Secretion System (T6SS) have been well studied (Allsopp et al., 2020; Pukatzki et al., 2007).

T6SS is a contractile nanomachine found in many gram-negative bacteria. T6SSs are categorized into four subtypes: T6SSⁱ mainly found in Pseudomonadota (Proteobacteria) and subdivided into subgroups (i1 to i5) based on various studies (Barret et al., 2011; Bayer-Santos et al., 2019; Bernal et al., 2018; Boyer et al., 2009), T6SSⁱⁱ specific to *Francisella* (de Bruin et

al., 2007; Clemens et al., 2015), T6SSⁱⁱⁱ present in Bacteroidetes (Russell et al., 2014), and T6SS^{iv} found in *Amoebophilus asiaticus* (Böck et al., 2017). T6SS is used by bacteria to inject effectors directly into prokaryotic or eukaryotic cells and, for few, in proximal environments (Allsopp and Bernal, 2023). It is composed of fourteen core component proteins. Toxic effectors are associated with the arrow of the system composed of the Hcp tube capped with the VgrG/PAAR spike. Surrounded by a contractile sheath, the arrow is propelled by mechanical force, allowing the delivery of toxic effectors into the target cell. Effectors are associated with cognate immunity proteins to prevent cell self-intoxication. Other non-immune defense mechanisms can also provide protection against T6SS attack, such as spatial separation and rapid growth, general stress responses, and the presence of physical barriers preventing T6SS from reaching its target (Hersch et al., 2020; Robitaille et al., 2021).

Competition-relatedness theory postulates that competition should be more intense between closely related species that may share similar functions and substrate affinities. Antagonism experiments between bacterial strains from a diverse range of phyla confirm this theory (Russel et al., 2017) but its demonstration was only based on diffusible toxic compounds.

In this work, we focus on *Stenotrophomonas rhizophila* CFBP13503, a seed-borne bacterial strain isolated from radish (Rezki et al., 2018) that displays a high transmission rate from seed to seedling (Simonin et al., 2023). *S. rhizophila* CFBP13503 possesses a T6SS cluster, which kills the phytopathogenic bacterium *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* 8004 (Xcc8004) *in vitro* and limits Xcc8004 populations *in planta* (Garin et al., 2024). Hence *S. rhizophila* CFBP13503 is a good candidate for studying the influence of interference competition mediated through T6SS in seedling community assembly. This study investigates the distribution of T6SS among seed-associated bacteria, exploring its impact on bacterial community dynamics *in vitro* using a synthetic community (SynCom) approach. Additionally, the SynCom approach was employed for *in planta* transmission assays to analyze the role of T6SS in shaping bacterial community dynamics during the transmission from seed to seedling.

2 | MATERIALS & METHODS

2.1 | Bacterial strains and growth conditions

The bacterial strains used in this study are listed in **Table S1**. Bacteria were grown at 28°C on Tryptic Soy Agar 1/10 strength (TSA10%: 17 g.l⁻¹ tryptone, 3 g.l⁻¹ soybean peptone, 2.5 g.l⁻¹ glucose, 5 g.l⁻¹ NaCl, 5 g.l⁻¹ K₂HPO₄, and 15 g.l⁻¹ agar) or Tryptic Soy Broth 1/10 strength (TSB10%) supplemented with rifampicin (50 µg.ml⁻¹).

2.2 | Phylogenetic analysis, prediction of functional trait and assessment of T6SS distribution

Phylogenomics of 180 bacterial genomes was performed using the following procedure <https://doi.org/10.5281/zenodo.46122>. Briefly, marker genes were extracted with AMPHORA2 (Wu and Scott, 2012). A total of 24 single-copy genes detected in all genome sequences were selected for subsequent phylogenetic analysis. Sequence alignment was performed with MUSCLE. Alignments were concatenated and a maximum likelihood phylogenetic tree was built with RAxML v8 (Stamatakis, 2014). Phylogenetic tree was displayed and annotated with iTol v6.8 (Letunic and Bork, 2021). The pairwise phylogenetic distances between *S. rhizophila* CFBP13503 and each bacterial strain was computed with the cophenetic.phylo function of the ape v5.7.1 package (Paradis and Schliep, 2019).

Prediction of functional traits from bacterial genomes was performed with microTrait v1.0.0 (Karaoz and Brodie, 2022). Resource acquisition traits (at granularity 3) were selected. The resource overlap between CFBP13503 and other bacterial strains was assessed by calculating the ratio of the number of common resource traits between CFBP13503 and a bacterial strain to the total number of resource traits of CFBP13503.

Detection of T6SS within genome sequences is based on the search for 10 Clusters of Orthologous Groups (COG3515, COG3516, COG3517, COG3518, COG3519, COG3520, COG3521, COG3522, COG3455, COG3523) specific to T6SS (Barret et al., 2013). Classification of T6SS was performed through analysis of TssB protein sequences (COG3516) with the SecReT6 database v3 (Zhang et al., 2023).

2.3 | *In vitro* SynCom confrontation assays

Forty-five bacterial strains isolated from seeds of radish and rapeseed were selected for *in vitro* confrontation assays (**Figure 1a**). These strains possess unique *gyrB* Amplicon Sequence Variants (ASVs) that are abundant and prevalent in seed microbiomes (**Figure 1c**). These strains were divided into 5 synthetic communities (SynComs) with different phylogenetic diversity (Faith's index) and number of T6SS loci (hereafter T6SS richness) (**Figure 1b, 1d**). Each of these 5 SynComs were supplemented with Xcc8004, a strain previously identified as sensitive to the T6SS of *S. rhizophila* CFBP13503 (Garin et al., 2024). Finally, each SynCom was mixed with either the WT strain *S. rhizophila* CFBP13503 or the isogenic T6SS deficient-mutant Δhcp impaired in T6SS functioning (Garin et al., 2024).

To construct each SynCom, bacterial strains were cultured overnight in 10 ml of TSB10% at 28°C under constant agitation (150 rpm). Overnight cultures were centrifuged (4,000 g, 8 min) and the resulting pellets were resuspended in sterile water at a bacterial concentration of 5.10^8 cells.ml⁻¹. Bacterial concentrations were determined according to correspondence between OD_{600nm} and number of colony-forming units (CFUs). SynCom were obtained by mixing equivalent volumes of each bacterial suspension (n=10). These initial SynCom mixtures were then combined with equal volumes of *S. rhizophila* CFBP13503 or the isogenic T6SS deficient mutant, resulting in confrontation mixtures containing 50% of *S. rhizophila* and 50% of the other SynCom members. Twenty μ l drops (n=10) were spotted on TSA10% and incubated at 28°C for 6 and 24 hours (4 repetitions per SynCom). Simultaneously, 500 μ l of each initial confrontation mixture were centrifuged (11,000 g, 5 min) and the resulting pellets were stored at -80°C for subsequent DNA extraction. After 6 and 24 hours of confrontation, inoculated spots were resuspended in 1.5 ml and 5 ml of sterile water, respectively. 500 μ l of these cell suspensions were centrifuged (11,000 g, 5 min) and the pellets were stored at -80°C. DNA extraction was performed with the Wizard® Genomic DNA Purification Kit (Promega) using supplier recommendations.

The relative abundance of each bacterial strain was assessed using *gyrB* amplicon sequencing (see below). To evaluate the enrichment or depletion of bacterial strains in response to the T6SS of *S. rhizophila* CFBP13503, we use the following formula $\log_2[(ab_{6h}/ab_{0h})_{WT} / (ab_{6h}/ab_{0h})_{\Delta hcp}]$, which measures change in relative abundance (ab) between the initial (0h) and 6-hour time points (6h) in presence (WT) and absence (Δhcp) of functioning T6SS.

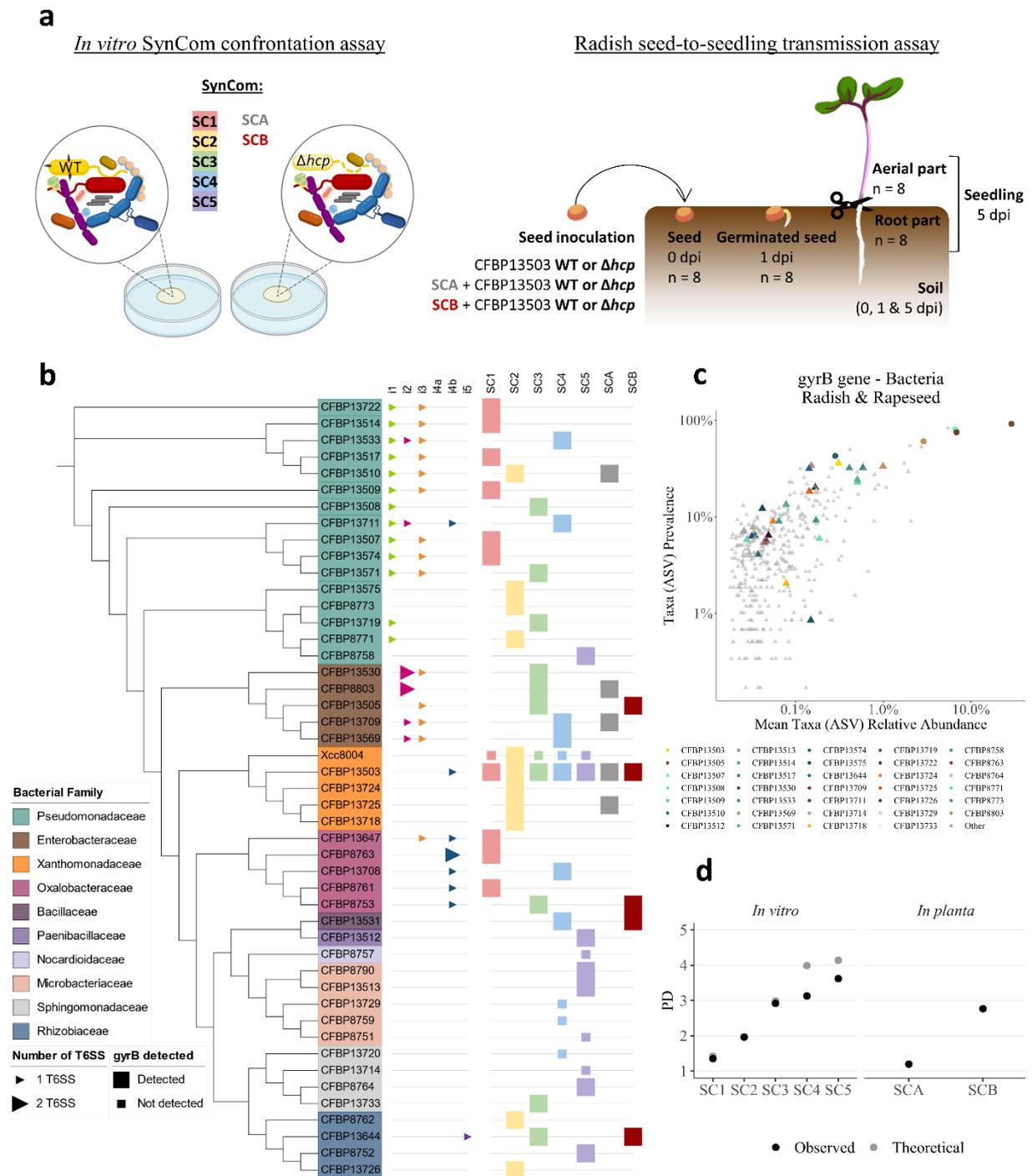


Figure 1. Overview of experimental designs. The impact of *S. rhizophila* CFBP13503 T6SS on the composition of synthetic communities (SynCom) was assessed *in vitro* across five SynComs and *in planta* across 2 SynComs (a). Phylogenetic relationships of the selected bacterial strains, presence of a T6SS cluster and distribution within SynComs are depicted in (b). Prevalence and abundance of the corresponding *gyrB* ASV in seed samples of radish and rapeseed are based on a seed microbiome meta-analysis (Simonin et al. 2022) (c). The theoretical and observed phylogenetic diversity (Faith's index) (=PD) of each SynComs is illustrated in (d).

2.4 | Pairwise confrontation assay *in vitro*

Change in strain abundance following confrontation with CFBP13503 WT or the isogenic T6SS-deficient mutant was validated by pairwise confrontation assays. Fourteen phylogenetically distinct strains were selected and spontaneous rifampicin-resistant (Rif^R variants) were subsequently generated. Growth monitoring was carried out in TSB10% during 24h under constant agitation (500 rpm) at 28°C for selecting Rif^R variants without fitness differences.

S. rhizophila CFBP13503, CFBP13503 Δ hcp and the selected Rif^R bacterial strains were cultured overnight in 10 mL of TSB10% at 28°C under constant agitation (150 rpm). Overnight cultures were centrifuged (4,000 g, 8 min) and the resulting pellets were resuspended in sterile water at an OD_{600nm} of 0.5, (approximately 10⁹ cells.ml⁻¹). One hundred μ l of Rif^R bacterial suspension and 100 μ l of *S. rhizophila* CFBP13503 (WT or Δ hcp) suspensions were mixed. As a control, 100 μ l of bacterial suspensions were mixed with 100 μ l of sterile water. Three individual 20 μ l drops were deposited on TSA10% and incubated at 28°C for 6 hours and 24 hours. Inoculated spots were resuspended in 2.5 ml of sterile water, serial diluted and plated on TSA10% either containing spectinomycin (50 μ g.ml⁻¹) and ampicillin (100 μ g.ml⁻¹) for *S. rhizophila* or rifampicin (50 μ g.ml⁻¹) for the Rif^R bacterial strains.

2.5 | Impact of the T6SS of CFBP13503 on bacterial communities' compositions during seedling transmission

The impact of *S. rhizophila* CFBP13503 T6SS on seedling transmission was evaluated by inoculating sterilized radish seeds (*Raphanus sativus* var. Flamboyant5) with *S. rhizophila* CFBP13503 WT or the isogenic T6SS-deficient mutant. Both strains were inoculated on radish seeds alone or in the presence of two SynComs, SCA and SCB (**Figure 1a**). SCA was composed of 4 T6SS-sensitive strains (CFBP8803, CFBP13510, CFBP13709 and CFBP13725), whereas SCB was assembled with 2 T6SS-sensitive strains (CFBP8753 and CFBP13505) and 2 T6SS-resistant strains (CFBP13531 and CFBP13644). The relative abundance of each strain was measured using *gyrB* amplicon sequencing on 8 individual seeds just before sowing (0 dpi), 8 individual germinated seeds after sowing (1 dpi) and 8 individual seedlings (5 dpi).

Bacterial suspensions were prepared at a concentration of 10⁹ cells.ml⁻¹ from 24h TSA10% plates. SynCom were obtained by mixing equivalent volumes of each bacterial suspension (n=4). These initial SynCom mixtures were then combined with equal volumes of *S. rhizophila*

CFBP13503 or the isogenic T6SS deficient mutant, resulting in mixtures containing 50% of *S. rhizophila* and 50% of the other SynCom members. Additionally both *S. rhizophila* strains (WT or Δhcp) were mixed with an equivalent volume of sterile water.

Radish seeds were surface-sterilized using the protocol employed in Simonin et al., 2023. Briefly, seeds were sonicated (40 Hertz, 1 min), then immersed in 96° ethanol (1 min), 2.6% sodium hypochlorite (5 min), 96° ethanol (30 s) and rinsed three times with sterile water. Sterilized seeds were dried (30 min) on sterile paper and distributed in subsamples of 60 seeds. These subsamples were inoculated with: sterile water (uninoculated control), CFBP13503WT, CFBP13503 Δhcp , SCA+CFBP1503WT, SCA+CFBP13503 Δhcp , SCB+CFBP13503WT, SCB+CFBP13503 Δhcp and incubated at 20°C (70 rpm, 15 min) before being dried on sterile paper (15 min). Forty seeds from each condition were subsequently sown in seedling cell trays containing unsterile, pre-moistened potting soil at a depth of 5mm. The trays were then placed in a growth chamber (photoperiod: 16h/8h, 20°C). Eight remaining seeds were individually resuspended in 1.5 ml of sterile water by vortexing for 30 seconds. Five hundred μ l were stored at -80°C and 200 μ l were diluted and plated on TSA10% (total bacteria) and TSA10%+Amp100+Spe50 (selective medium for CFBP13503). Eight germinated seeds (1 dpi) per condition were individually placed in sterile bags containing 2 ml of sterile water and 500 μ l and 200 μ l of the resulting suspensions were stored at -80°C and diluted and plated, respectively. Eight seedlings per condition were collected at 5 dpi. The aerial parts and the roots were separated, removing as much adhering soil as possible. Each part was placed individually in sterile bags with 2 mL of sterile water and processed like germinated seeds. At each time point (0, 1 and 5 dpi) soil samples were collected and stored at -80°C.

2.6 | *gyrB* amplicon sequencing

Community profiling was performed through *gyrB* amplicon sequencing following the procedure described earlier (Barret et al., 2015). Briefly the first PCR step was performed with the *gyrB*_aF64/*gyrB*_aR553 primer set and a high-fidelity Taq DNA polymerase (AccuPrime™ Taq DNA Polymerase High Fidelity, Invitrogen, Carlsbad, California, USA). The PCR products were subsequently purified using magnetic beads (Sera-Mag™, Merck, Kenilworth, New Jersey). A second PCR was conducted to add Illumina adapters and barcodes to the amplicons. The resulting PCR products were purified again using magnetic beads and pooled together.

The concentration of the pooled amplicon library was quantified using quantitative PCR (KAPA Library Quantification Kit, Roche, Basel, Switzerland). Amplicon library was mixed with 5% of PhiX and sequenced with a MiSeq reagent kits v3 600 cycles (Illumina, San Diego, California, USA). A blank extraction kit control, a PCR-negative control and PCR-positive control (*Lactococcus piscium*, a fish pathogen that is not plant-associated) were included in each PCR plate. The raw amplicon sequencing data are available on the European Nucleotide Archive (ENA) with the accession number XXXX and YYYY.

Sequence analyses of *gyrB* were performed as follows. Primer sequences were removed with cutadapt 2.7 (Martin, 2011) and trimmed fastq files were processed with DADA2 version 1.10 (Callahan et al., 2016). The following parameters were employed for sequence filtering and trimming: truncLen=c(200,150), maxN=0, maxEE=c(1,1), truncQ=5. Chimeric sequences were identified and removed with the removeBimeraDenovo function of DADA2. Amplicon Sequence Variant (ASV) taxonomic affiliations were performed with a naive Bayesian classifier (Wang et al., 2007) with our in-house *gyrB* database (train_set_gyrB_v5.fa.gz) available upon request. Unassigned sequences at the phylum level and *parE* sequences (a *gyrB* paralog) were filtered. The identification of sequence contaminants was assessed using decontam version 1.8.0 based on our negative controls.

Diversity analyses were conducted with PhyloSeq 1.40.0 (McMurdie and Holmes, 2013). Alpha-diversity indices (richness and Pielou's evenness) were calculated after rarefaction of 3,900 (*in vitro* assay) and 5,000 (*in planta* assay) reads per sample. Changes in bacterial phylogenetic composition were estimated with weighted UniFrac distances (Lozupone and Knight, 2005). A permutational multivariate analysis of variance was performed with the adonis2 function of vegan 2.6.4. Changes in relative abundance was assessed with the microViz v 0.10.5 package (Barnett et al., 2021) using a beta-binomial regression model provided in the corncob v 0.3.1 package (Martin et al., 2020). Taxa were filtered at a minimum prevalence threshold of 0.5. Changes in relative abundances were considered as significant at a p-value < 0.05.

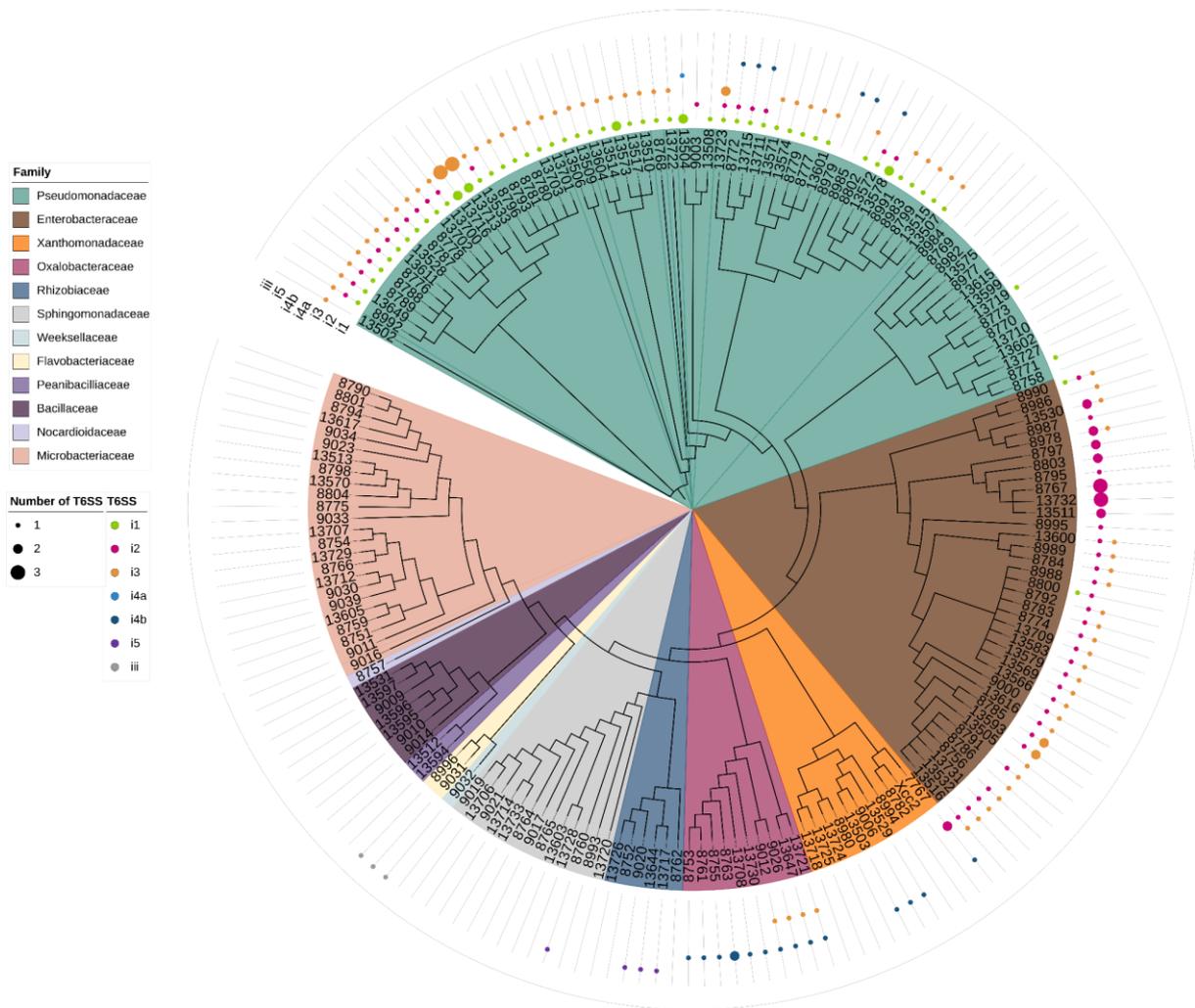


Figure 2. T6SS distribution among seed-associated bacteria. Maximum likelihood (PhyML) phylogenetic tree was constructed using 24 marker genes from a dataset of 180 genomes of seed-associated bacterial isolates. Bacteria are color-coded according to their phylogenetic families. The presence of the T6SS is determined based on the existence of 10 Clusters of Orthologous Groups specific to T6SS. T6SS clusters are colored according to their classification, which was determined through an analysis of the conserved TssB protein. The sizes of the shapes correspond to the number of T6SS belonging to a specific group present in the bacterial genomes.

3 | RESULTS

3.1 | T6SS is highly prevalent among seed-associated bacteria

Among 180 genomes of seed-associated bacteria isolated from radish, bean, and rapeseed seeds, 61.7% (111 genomes) possess at least one T6SS cluster (**Figure 2**). T6SS is detected in all bacterial families analyzed, except for genomes of monoderms (e.g. *Bacillaceae*, *Paenibacillaceae*, *Microbacteriaceae* and *Nocardioidaceae*), which do not contain diderm-like protein secretion systems (Abby et al., 2016). Most T6SS clusters (n=229) belong to T6SS subtype i (n=226), while subtype iii was restricted to the Bacteroidetes families *Weeksellaceae* (n=1) and *Flavobacteriaceae* (n=2). Among T6SS subtype i, the following groups were detected: i1 (n=57), i2 (n=63), i3 (n=80), i4a (n=1), i4b (n=21), i5 (n=4). Seed-associated bacteria possess on average 1.6 T6SS clusters per genome with a range of 1 to 5 clusters per genome. Overall, T6SS is highly prevalent among seed-associated bacteria and might play a significant role for the colonization of the seed habitat.

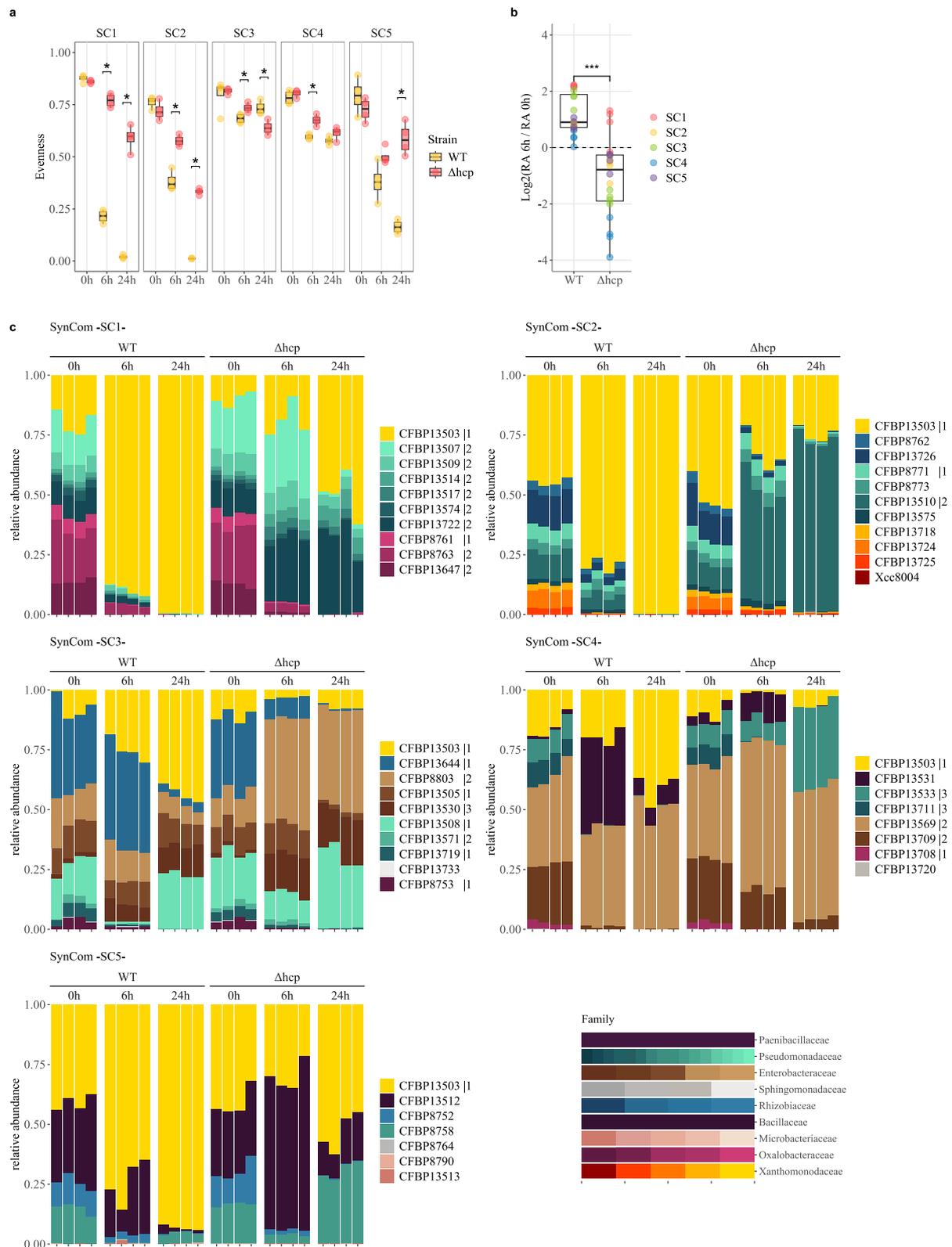


Figure 3. T6SS impact on the structure of bacterial synthetic communities *in vitro*. (a) Evenness of bacterial communities during confrontations with *S. rhizophila* CFBP13503 wild type (WT) and the T6SS mutant Δ hcp at different time points (0h, 6h and 24h). (b) Relative abundance (RA) variation of *S. rhizophila* CFBP13503 wild-type between 0h and 6h. (c) Relative abundance of bacterial taxa within five different synthetic communities (SynCom) at different confrontation times (0h, 6h, and 24h) while competing with the wild-type strain of *S. rhizophila* CFBP13503 (WT) or the T6SS-deficient mutant Δ hcp.

3.2 | *S. rhizophila* CFBP13503 T6SS shapes the structure of bacterial SynComs *in vitro*

Under the experimental condition, Time (0h, 6h, 24h) was the most important driver of phylogenetic community composition (weighted UniFrac distance) explaining 42% to 74% of variance (**Figure S1**). Confrontations between SynComs and CFBP13503 (WT or Δhcp) significantly impacted the phylogenetic composition of all SynComs ($P < 0.001$), explaining 9% to 19% of variance (**Figure S1**).

A significant increase ($P < 0.05$) in strain evenness was observed from time 6h for almost all SynComs (except for SC5) when communities were inoculated with the T6SS-deficient mutant of CFBP13503 (**Figure 3a**). This increase in evenness was partly due to the significant reduction of the relative abundance (RA) of Δhcp in comparison to the WT (**Figure 3b** and **3c**). Moreover, a significant overdispersion of the RA of Δhcp was observed at this time point (**Figure 3b**).

Changes in RA of other SynCom members were also monitored after 6 hours of confrontation. A decrease in RA of all bacterial strains affiliated to Pseudomonadaceae, Enterobacteriaceae, and Xanthomonadaceae was observed during confrontation with the WT (**Figure 4a**). In contrast, bacterial strains belonging to Bacillaceae, Microbacteriaceae, and Rhizobiaceae were enriched when inoculated with the WT. Overall, these results indicate that the T6SS of *S. rhizophila* CFBP13503 targets phylogenetically distinct taxonomic groups. Only the Oxalobacteraceae family seems to respond in contrasting ways to the presence of *S. rhizophila* T6SS, with two strains (CFBP8761 and CFBP13708) showing a reduction in RA and two strains displaying an increase in RA (CFBP8753 and CFBP8763) during confrontation with CFBP13503 WT. Interestingly strains with a decrease in RA were phylogenetically closer to *S. rhizophila* CFBP13503 than enriched strains (**Figure S2A**). This relationship could be explained by their greater resource overlap with CFBP13503 (**Figure S2B**).

Given that some T6SS are specifically activated when bacteria are attacked by T6SS or bacterial competitors (Basler et al., 2013; Kamal et al., 2020), the impact of T6SS richness (and diversity) in SynCom composition was investigated. We hypothesized that some strains with T6SSs will respond to the attack of *S. rhizophila* CFBP13503 and therefore will have no or moderate changes in RA. According to our results it seems that changes in RA of strains were independent of the number of T6SS. For instance, all the *Pseudomonas* strains investigated were depleted during confrontation with the WT despite having 0 to 5 T6SS clusters in their genome sequences.

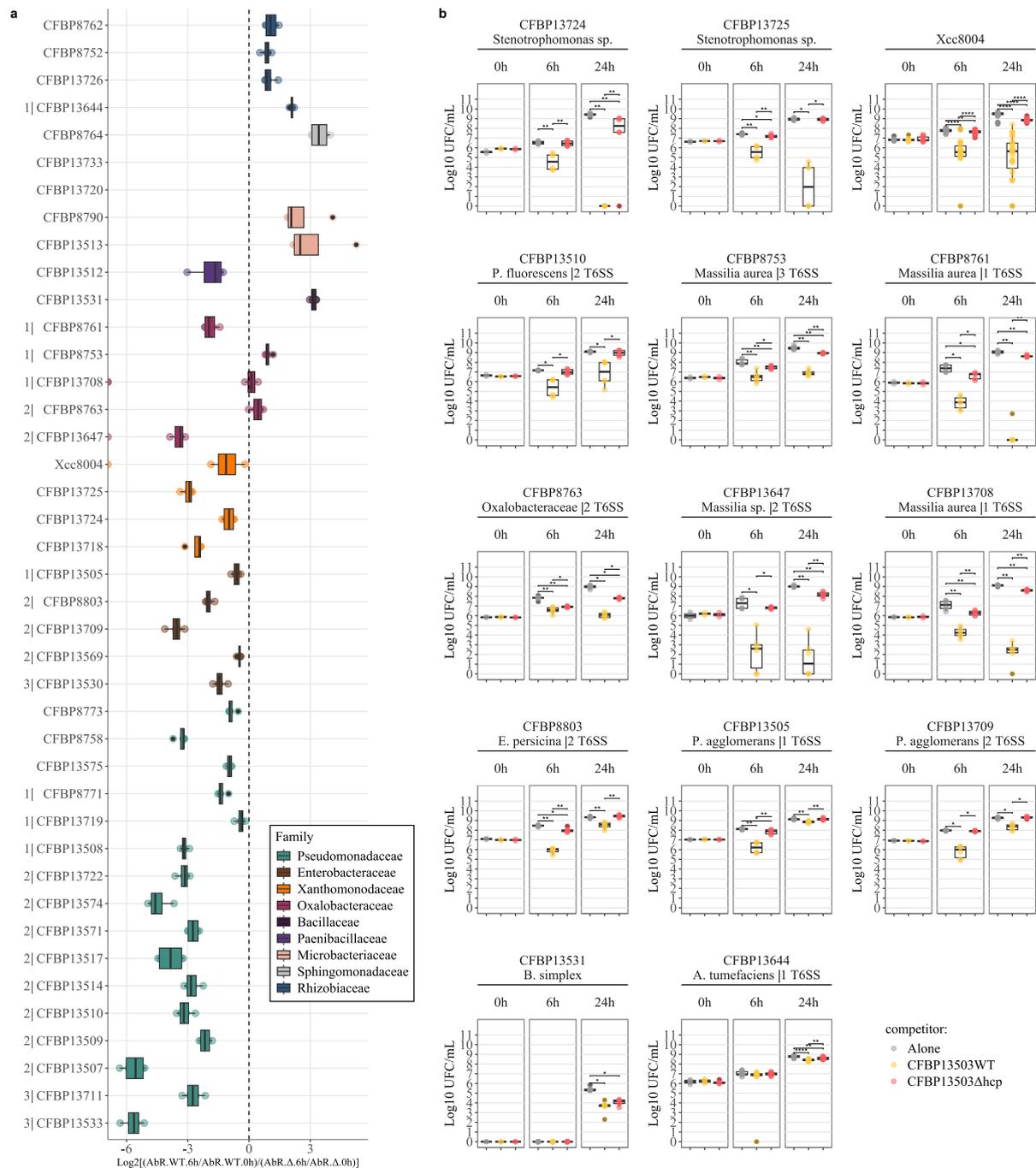


Figure 4. Enrichment/depletion of bacteria in the presence of *S. rhizophila* CFBP13503 T6SS and pairwise comparison assays *in vitro*. (a) Log₂ of ratio of the relative abundance variation between 0 hours and 6 hours of confrontations in WT condition compared to Δhcp condition. (b) Confrontation between rifampicin-resistant variant and *S. rhizophila* CFBP13503 wild-type or T6SS-deficient mutants Δhcp in TSA10 medium for 6h and 24h. Colony-forming units (CFU) were quantified on TSA10 supplemented with rifampicin. Six or 15 (Xcc8004) replicates are plotted. Statistical analyses were performed using Wilcoxon-Mann-Whitney Test (* p-value < 0.05; ** p-value < 0.005).

To confirm that the depletion and enrichment of bacterial strains observed with *gyrB* amplicon sequencing was associated to sensitivity or resistance to the T6SS of CFBP13503, pairwise confrontation assays between CFBP13503 (WT or Δhcp) and rifampicin-resistant variants of 14 strains were performed. This experiment validated the differences in RA observed with *gyrB* for 12 of the 14 strains tested (**Figure 4b**). More precisely, we confirmed the resistance of strains CFBP13531 (*Bacillaceae*) and CFBP13644 (*Rhizobiaceae*) to the T6SS of *S. rhizophila* CFBP13503. Additionally, we confirmed the sensitivity of the following strains: CFBP13510 (*Pseudomonadaceae*), CFBP13505, CFBP13709 (*Enterobacteriaceae*), CFBP8803 (*Erwiniaceae*), CFBP8761, CFBP13708 (*Oxalobacteraceae*), and CFBP13724, CFBP13725, and Xcc8004 (*Xanthomonadaceae*). The two strains belonging to the *Oxalobacteraceae* family (CFBP8761 and CFBP13647) showed discordant responses between SynComs amplicon sequencing data and binary confrontation tests (**Figure 4**). Hence all *Oxalobacteraceae* strains tested in this work are sensitive to the T6SS of *S. rhizophila* CFBP13503. Interestingly, during pairwise confrontation assays, the population of *S. rhizophila* CFBP13503 was either not impacted or only slightly affected by other bacterial strains, even when these strains possessed T6SS clusters (**Figure S3**).

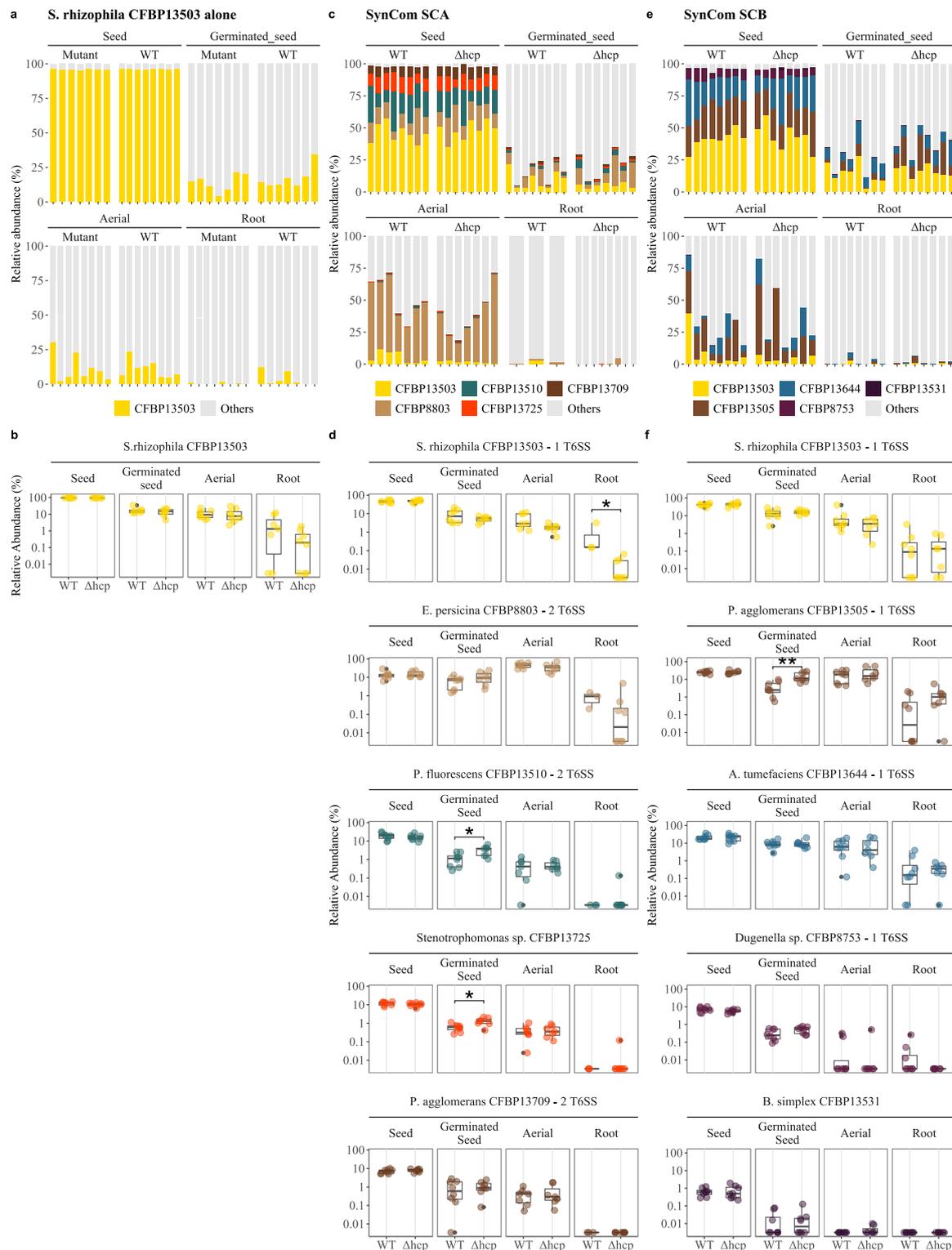


Figure 5. Relative abundance of *S. rhizophila* CFBP13503 and SynCom members. (a) Relative abundance profile of bacterial communities on seeds, germinated seed, and seedling (aerial and root parts) when seeds are inoculated with *S. rhizophila* CFBP13503 WT or Δhcp alone or in co-inoculation with SCA and SCB. Each stacked bar represents an individual and colors represent inoculated bacteria or native bacteria (grey). **(b)** Relative abundance (log10 of percent) of seed inoculated bacteria when inoculated with *S. rhizophila* CFBP13503 WT or Δhcp . Statistical analyses were performed using Wilcoxon-Mann-Whitney test (* p-value < 0.05)

3.3 | *S. rhizophila* CFBP13503 T6SS influences specific bacterial taxa transmission from seed to seedling

The broad host range of the T6SS of *S. rhizophila* CFBP13503 observed *in vitro* questions (i) the role of this system in the seedling transmission capacity of this strain and (ii) its involvement in community assembly in soil microbiome competition context.

Since *S. rhizophila* CFBP13503 is efficiently transmitted to seedlings of radish under gnotobiotic conditions (Simonin et al., 2023), we used this plant species to investigate its T6SS impact on microbiota transmission but in living potting soil. We first inoculated seeds with *S. rhizophila* CFBP13503 WT or Δhcp alone and collected germinated seeds and seedlings. Under these experimental conditions, *S. rhizophila* was efficiently transmitted to germinated seeds (15% of relative abundance) and to the aerial parts of seedling (11%). In contrast, the relative abundance of CFBP13503 in the root parts of seedling (2%) was low (**Figure 5b**). No significant differences in *S. rhizophila* relative abundance (**Figure 5b**) and population size (**Figure S6**) were observed between the WT and T6SS-deficient strains in all studied habitats.

To test the impact of *S. rhizophila* T6SS on seedling microbiota assembly, a second treatment was carried out with inoculation of seeds with WT and Δhcp strains but in two SynComs, low (SCA) and of high (SCB) phylogenetic diversity (**Figure 1d**). When *S. rhizophila* was inoculated with the low-diversity community, T6SS-deficient population sizes were significantly less abundant in seed, germinated-seeds and aerial parts of the seedlings compared to wild-type (**Figure S6**). Moreover, relative abundances of these T6SS-deficient strains were also negatively impacted in both the aerial part and root compartments of the seedlings (**Figure 5; Table 1**). Such effects were not observed when *S. rhizophila* was inoculated in the high-diversity SCB community. SCA was assembled using 4 T6SS-sensitive strains (CFBP8803, CFBP13510, CFBP13709 and CFBP13725), whereas SCB was assembled with 2 T6SS-sensitive strains (CFBP8753 and CFBP13505) and 2 T6SS-resistant strains (CFBP13531 and CFBP13644) (**Figure 4b, S3**). In SCA, the strains CFBP13510 and CFBP13725 were significantly depleted in the presence of *S. rhizophila* WT on germinated seeds, while the relative abundance of CFBP8803 and CFBP13709 remained unaffected (**Figure 5d**). Among the T6SS-sensitive strains within SCB, only CFBP13505 showed significant relative abundance difference between the two conditions tested (**Figure 5f**). CFBP8753 and the T6SS-resistant strains CFBP13531 and CFBP13644 were not impacted (**Figure 5f**).

Table 1. List of non-inoculated taxa affected by the T6SS of CFBP13503 in three microbial environments after seed inoculation with (i) *S. rhizophila* alone (no SC), (ii) *S. rhizophila* and SCA (SCA), (iii) *S. rhizophila* and SCB (SCB). Values represent Log₂ (relative abundance WT vs Δhcp). A positive value represents an enrichment in the WT condition whereas a negative value represents an enrichment in the Δhcp condition (cutoff = 1 and P < 0.05). A dot point means no significant value. GS is germinated seeds.

Taxa at species level	no SC			SCA			SCB		
	GS	Aerial	Root	GS	Aerial	Root	GS	Aerial	Root
Alphaproteobacteria Class	.	.	1.03
<i>Bradyrhizobiaceae</i> Family	.	.	-1.50
Burkholderiales Order	-1.22
<i>Buttiauxella</i> unclassified	.	1.21
<i>Chitinophagaceae</i> Family	.	.	.	-1.16
Gammaproteibacteria Class	.	.	.	-1.19
<i>Methylophilaceae</i> Family	.	4.63
<i>Microbacteriaceae</i> Family	.	1.37
<i>Oxalobacteraceae</i> Family	.	.	2.48
<i>Peanibacillus</i> unclassified	1.59	.	.
<i>Pantoea agglomerans</i>	-1.49	.	.
<i>Paraburkholderia</i> unclassified	1.44	.	.	.
<i>Polaromonas</i> unclassified	1.08
<i>Pseudomonas</i> Genus	1.31	.	.	.
<i>Rahnella aquatilis</i>	.	-2.21
<i>S. rhizophila</i> CFBP13503	1.13	4.28	.	.	.

As SynCom members represented at best 50% of germinated-seed and seedling communities (**Figure 5a, 5c, 5e**), the impact of CFBP13503 T6SS on native soil microbiota transmitted was next investigated. Alpha-diversity metrics (i.e. community richness and evenness) were not significantly impacted by T6SS of *S. rhizophila* (**Figure S5a**). A weak (2% of variance) but significant ($P < 0.001$) impact of T6SS was observed on bacterial phylogenetic composition. To determine the identity of taxa affected by *S. rhizophila* T6SS, the relative abundances of bacterial species within each community inoculated either with the WT strain or the T6SS-deficient mutant were compared (**Table 1**). Surprisingly most species were enriched with WT strain inoculation, which indicates a potential resistance of these strains against the T6SS of *S. rhizophila*. These species were affiliated to alpha and beta-Proteobacteria as well as Actinobacteria and Firmicutes. The few species negatively impacted by the T6SS of CFBP13503 were frequently related to gamma-proteobacteria (e.g. *Pantoea agglomerans*, *Rahnella aquatilis*), which confirmed previous results obtained during *in vitro* confrontations assays.

4 | DISCUSSION

T6SS is frequently found in Gram-negative bacteria with 17,183 putative T6SS gene clusters detected in 7,617 genomic sequences out of 26,573 as of November 2021 (Zhang et al., 2023). Analysis of a diversity of bacterial strains isolated from radish, rapeseed and bean seed samples showed that 60% of genomic sequences had a T6SS secretion system predominantly affiliated to the T6SSⁱ. This percentage rises to 75% when only Pseudomonada are considered. This high prevalence raises questions about the role of T6SS in the seed habitat and in the first phases of seedling colonization by seed-borne bacterial strains.

The T6SS of *S. rhizophila* CFBP13503, which belongs to cluster i4b, is involved in growth inhibition of the plant pathogen *X. campestris* pv. *campestris* both *in vitro* and *in planta* (Garin et al., 2024). In the present work, we have demonstrated that this effect is involved in the inhibition of a broad spectrum of seed-borne bacteria belonging to the *Erwiniaceae*, *Lysobacteraceae*, *Oxalobacteraceae* and *Pseudomonadaceae*. The diversity of prey targeted by a single T6SS is not specific to *S. rhizophila* CFBP13503. For instance, the T6SS i4b of the plant-associated bacterial strains *Pseudomonas putida* KT2440 (Bernal et al., 2017), *Burkholderia gladioli* NGJ1 (Yadav et al., 2021) or *Paraburkholderia sabiae* LMG24235 (Hug et al., 2023) are involved in inhibition of a range of phytopathogenic agents including

Agrobacterium tumefaciens, *Pectobacterium carotovorum*, *Pseudomonas syringae*, *Ralstonia solanacearum* and *Xanthomonas campestris*. Nevertheless, a strong relationship between the phylogenetic proximity of strains to *S. rhizophila* CFBP13503 and their susceptibility to its T6SS was observed. This suggests that interference competition mediated through T6SS-contact dependent is more prevalent among phylogenetically similar species. Moreover, building on predictions of resource acquisition pathways from bacterial strain genomes, the closer bacteria are to *S. rhizophila* CFBP13503, the more likely they are to be susceptible to its T6SS. In multispecies biofilms, the confrontation of *P. putida* KT2440 with soil communities revealed similar results, where metabolic similarities led to an enhancement of T6SS antimicrobial activity (Xiong et al., 2024). Taken together, these observations indicate that resource overlap drives the evolution of T6SS-mediated competition in a manner analogous to that observed for contact-independent inhibition (Russel et al., 2017).

The inhibition of a wide range of prey species by *S. rhizophila* T6SS could be explained by its large predicted T6SS effector repertoire (n=9), which cover a large variety of potential activities including phospholipases, amidases, pore-forming effectors, and DNases (Garin et al., 2024). Given the generic nature of these activities, it is interesting to understand why certain bacterial families are sensitive while others are resistant. It is highly probable that the resistance of strains to the T6SS of CFBP13503 is related to immunity-independent mechanisms (Hersch et al., 2020). For instance, all the monoderm strains tested in this work, except for one *Paenibacillus* strain, are resistant to the T6SS of CFBP13503. This resistance could be explained by the thick peptidoglycan layer of monoderms, which requires specific T6SS effectors to be perforated (Le et al., 2021; Pei et al., 2022) or the induction of survival mechanisms such as sporulation, which has been observed in *B. subtilis* in response to the secretion of a muramidase-type effector secreted by *P. chlororaphis* (Pérez-Lorente et al., 2023). Concerning *Oxalobacteraceae*, while certain strains exhibit resistance within the communities, they paradoxically show susceptibility when individually confronted with *S. rhizophila* CFBP13503. The varied responses of *Oxalobacteraceae* could be attributed to collective protection within communities. This type of protection has been observed in *E. coli*, where the secretion of exopolysaccharides (EPS) serves to shield unproductive EPS strains from the T6SS of *Acinetobacter baylyi* (Granato et al., 2023).

T6SS can be assembled in different ways from random firing (e.g. *Vibrio cholerae* - Basler et al., 2012) to specific response to T6SS attack (e.g. *Pseudomonas aeruginosa* – Basler et al., 2013). The T6SS i4b of *S. rhizophila* CFBP13503 possesses an ortholog of TslA, a periplasmic protein involved in T6SS assembly at the site of contact between neighboring cells (Lin et al., 2022). Hence it is likely that the T6SS of *S. rhizophila* CFBP13503 is activated during contact with prey cells in our *in vitro* confrontation assays. By defining synthetic communities with different T6SS diversity, we anticipated a response from T6SS-positive strains that have notably a tit-for-tat strategy (i.e. some *Pseudomonas* strains with a T6SS i3). This response should ultimately limit the competitive advantage of CFBP13503 in these T6SS-positive communities. According to *gyrB* amplicon sequencing, the richness and diversity of T6SS in SynComs were not correlated to CFBP13503 relative abundance. Several factors may explain this observation, including the high ratio of CFBP13503 in relation to the preys or a large spectrum of immunity against other bacteria T6SS effectors or the T6SS systems of the other bacterial competitors might not be actively functioning under *in vitro* conditions. Indeed, the T6SS is a tightly regulated mechanism, with its expression being responsive to an array of biotic and/or abiotic factors (Bernal et al., 2023; Hespanhol et al., 2023; Marchi et al., 2013).

Given that the environment can affect the regulation of the T6SS, the effectiveness of associated effectors, and the response/susceptibility of target cells to attacks, conducting *in planta* experiments became crucial, as they may produce distinct outcomes compared to *in vitro* assays. We then investigated how *S. rhizophila* CFBP13503 T6SS impacts bacterial community dynamics during seed-to-seedling transmission, aiming to observe bacteria responses within their natural environment. Using *gyrB* metabarcoding, we tracked the transmission of two synthetic communities and soil-associated bacteria across various stages of plant development, encompassing seeds, germinated seeds, and seedlings. The different SynCom members successfully colonized the seeds, resulting in distinct community compositions at the seed stage. However, a convergence in community composition was detected upon seed germination, which reflects a preferential colonization of this habitat by soil-borne taxa as already observed in rapeseed and wheat (Rocheffort et al., 2021; Walsh et al., 2021). While the T6SS of *S. rhizophila* CFBP13503 was not an important driver of community composition, changes in relative abundances of SynCom members and soil-borne strains were detected especially in germinating seeds. However, a subset of SynCom members

(CFBP13709, CFBP8803, and CFBP8753) remained unaffected. This disparity in response could be attributed to the contrasting environments of *in vitro* confrontation assays, where direct cell-to-cell contact occurs within a confined space, and the more complex spatial dynamics introduced by seed germination and plant growth. The intricate nature of seed germination and plant growth introduces substantial spatial disruptions, a phenomenon demonstrated to increasingly favor sensitive strains that can evade contact with T6SS-producing cells (Steinbach et al., 2020). Furthermore, to discern the direct impacts of T6SS on a bacterial member, co-localization is essential (Lin et al., 2023). The precise nature of the impact of *S. rhizophila* T6SS on individual bacterial taxa, whether direct or indirect, remains to be determined. Nonetheless, our study elucidates a clear pattern: while T6SS exerts a negative and specific impact on certain bacterial taxa, it simultaneously creates a favorable environment for other taxa. These changes in bacterial taxa distribution have cascading effects on bacterial interactions, resulting in distinct community dynamics.

REFERENCES

- Abby, S.S., Cury, J., Guglielmini, J., Néron, B., Touchon, M. & Rocha, E.P.C. (2016) Identification of protein secretion systems in bacterial genomes. *Scientific Reports*, 6, 23080. <https://doi.org/10.1038/srep23080>.
- Allsopp, L.P. & Bernal, P. (2023) Killing in the name of: T6SS structure and effector diversity. *Microbiology*, 169, 001367. <https://doi.org/10.1099/mic.0.001367>.
- Allsopp, L.P., Bernal, P., Nolan, L.M. & Filloux, A. (2020) Causalities of war: the connection between type VI secretion system and microbiota. *Cellular Microbiology*, 22, e13153. <https://doi.org/10/gpcjdb>.
- Barnett, D.J. m, Arts, I.C. w & Penders, J. (2021) microViz: an R package for microbiome data visualization and statistics. *Journal of Open Source Software*, 6, 3201. <https://doi.org/10.21105/joss.03201>.
- Barret, M., Briand, M., Bonneau, S., Prévieux, A., Valière, S., Bouchez, O., et al. (2015) Emergence shapes the structure of the seed microbiota Drake, H.L. (Ed.). *Applied and Environmental Microbiology*, 81, 1257–1266. <https://doi.org/10/f6zrxf>.
- Barret, M., Egan, F., Fargier, E., Morrissey, J.P. & O’Gara, F. (2011) Genomic analysis of the type VI secretion systems in *Pseudomonas spp.*: novel clusters and putative effectors uncovered. *Microbiology (Reading, England)*, 157, 1726–1739. <https://doi.org/10/ctzxb8>.
- Barret, M., Egan, F. & O’Gara, F. (2013) Distribution and diversity of bacterial secretion systems across metagenomic datasets. *Environmental Microbiology Reports*, 5, 117–126. <https://doi.org/10/f4nn9v>.
- Basler, M., Ho, B.T. & Mekalanos, J.J. (2013) Tit-for-Tat: type VI secretion system counterattack during bacterial cell-cell interactions. *Cell*, 152, 884–894. <https://doi.org/10/f4nxs2>.
- Basler, M., Pilhofer, M., Henderson, G.P., Jensen, G.J. & Mekalanos, J.J. (2012) Type VI secretion requires a dynamic contractile phage tail-like structure. *Nature*, 483, 182–186. <https://doi.org/10.1038/nature10846>.
- Bayer-Santos, E., Ceseti, L. de M., Farah, C.S. & Alvarez-Martinez, C.E. (2019) Distribution, function and regulation of type 6 secretion systems of *Xanthomonadales*. *Frontiers in Microbiology*, 10, 1635. <https://doi.org/10/gpcjck>.
- Bernal, P., Allsopp, L.P., Filloux, A. & Llamas, M.A. (2017) The *Pseudomonas putida* T6SS is a plant warden against phytopathogens. *The ISME Journal*, 11, 972–987. <https://doi.org/10/f9j9z8>.
- Bernal, P., Civantos, C., Pacheco-Sánchez, D., Quesada, J.M., Filloux, A. & Llamas, M.A. (2023) Transcriptional organization and regulation of the *Pseudomonas putida* K1 type VI secretion system gene cluster. *Microbiology*, 169, 001295. <https://doi.org/10.1099/mic.0.001295>.
- Bernal, P., Llamas, M.A. & Filloux, A. (2018) Type VI secretion systems in plant-associated bacteria. *Environmental Microbiology*, 20, 1–15. <https://doi.org/10/gpcjb8>.
- Böck, D., Medeiros, J.M., Tsao, H.-F., Penz, T., Weiss, G.L., Aistleitner, K., et al. (2017) In situ architecture, function, and evolution of a contractile injection system. *Science*, 357, 713–717. <https://doi.org/10.1126/science.aan7904>.
- Boyer, F., Fichant, G., Berthod, J., Vandenbrouck, Y. & Attree, I. (2009) Dissecting the bacterial type VI secretion system by a genome wide in silico analysis: what can be learned from available microbial genomic resources? *BMC genomics*, 10, 104. <https://doi.org/10/d9zrmt>.
- Bruin, O.M. de, Ludu, J.S. & Nano, F.E. (2007) The *Francisella* pathogenicity island protein IgIA localizes to the bacterial cytoplasm and is needed for intracellular growth. *BMC Microbiology*, 7, 1. <https://doi.org/10.1186/1471-2180-7-1>.
- Callahan, B.J., McMurdie, P.J., Rosen, M.J., Han, A.W., Johnson, A.J.A. & Holmes, S.P. (2016) DADA2: High-resolution sample inference from Illumina amplicon data. *Nature Methods*, 13, 581–583. <https://doi.org/10.1038/nmeth.3869>.
- Clemens, D.L., Ge, P., Lee, B.-Y., Horwitz, M.A. & Zhou, Z.H. (2015) Atomic structure of T6SS reveals interlaced array essential to function. *Cell*, 160, 940–951. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2015.02.005>.

- Darrasse, A., Darsonval, A., Boureau, T., Brisset, M.-N., Durand, K. & Jacques, M.-A. (2010) Transmission of plant-pathogenic bacteria by nonhost seeds without induction of an associated defense reaction at emergence. *Applied and Environmental Microbiology*, 76, 6787–6796. <https://doi.org/10/dkrbcm2>.
- Garin, T., Brin, C., Prévieux, A., Brault, A., Briand, M., Simonin, M., et al. (2024) The type VI secretion system of *Stenotrophomonas rhizophila* CFBP13503 limits the transmission of *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* 8004 from radish seeds to seedlings. *Molecular Plant Pathology*, 25, e13412. <https://doi.org/10.1111/mpp.13412>.
- Granato, E.T., Meiller-Legrand, T.A. & Foster, K.R. (2019) The evolution and ecology of bacterial warfare. *Current Biology*, 29, R521–R537. <https://doi.org/10/ggjr4m>.
- Granato, E.T., Smith, W.P.J. & Foster, K.R. (2023) Collective protection against the type VI secretion system in bacteria. *The ISME Journal*, 17, 1052–1062. <https://doi.org/10.1038/s41396-023-01401-4>.
- Hersch, S.J., Manera, K. & Dong, T.G. (2020) Defending against the type six secretion system: beyond immunity genes. *Cell Reports*, 33, 108259. <https://doi.org/10/gpcjdr>.
- Hespanhol, J.T., Nóbrega-Silva, L. & Bayer-Santos, E. (2023) Regulation of type VI secretion systems at the transcriptional, posttranscriptional, and posttranslational level. *Microbiology*, 169, 001376. <https://doi.org/10.1099/mic.0.001376>.
- Hug, S., Heiniger, B., Bolli, K., Paszti, S., Eberl, L., Ahrens, C.H., et al. (2023) *Paraburkholderia sabiae* uses one type VI secretion system (T6SS-1) as a powerful weapon against notorious plant pathogens. *Microbiology Spectrum*, 11, e01622-23. <https://doi.org/10.1128/spectrum.01622-23>.
- Johnston-Monje, D., Gutiérrez, J.P. & Lopez-Lavalle, L.A.B. (2021) Seed-Transmitted Bacteria and Fungi Dominate Juvenile Plant Microbiomes. *Frontiers in Microbiology*, 12, 737616. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.737616>.
- Kamal, F., Liang, X., Manera, K., Pei, T.-T., Kim, H., Lam, L.G., et al. (2020) Differential cellular response to translocated toxic effectors and physical penetration by the type VI secretion system. *Cell Reports*, 31, 107766. <https://doi.org/10/gpcjdv>.
- Karaoz, U. & Brodie, E.L. (2022) microTrait: A Toolset for a Trait-Based Representation of Microbial Genomes. *Frontiers in Bioinformatics*, 2, 918853. <https://doi.org/10.3389/fbinf.2022.918853>.
- Kim, H., Jeon, J., Lee, K.K. & Lee, Y.-H. (2022) Longitudinal transmission of bacterial and fungal communities from seed to seed in rice. *Communications Biology*, 5, 1–14. <https://doi.org/10.1038/s42003-022-03726-w>.
- Koch, A.L. (2001) Oligotrophs versus copiotrophs. *BioEssays: News and Reviews in Molecular, Cellular and Developmental Biology*, 23, 657–661. <https://doi.org/10.1002/bies.1091>.
- Le, N.-H., Pinedo, V., Lopez, J., Cava, F. & Feldman, M.F. (2021) Killing of Gram-negative and Gram-positive bacteria by a bifunctional cell wall-targeting T6SS effector. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 118, e2106555118. <https://doi.org/10.1073/pnas.2106555118>.
- Letunic, I. & Bork, P. (2021) Interactive Tree Of Life (iTOL) v5: an online tool for phylogenetic tree display and annotation. *Nucleic Acids Research*, 49, W293–W296. <https://doi.org/10.1093/nar/gkab301>.
- Lin, L., Capozzoli, R., Ferrand, A., Plum, M., Vettiger, A. & Basler, M. (2022) Subcellular localization of Type VI secretion system assembly in response to cell–cell contact. *The EMBO Journal*, 41, e108595. <https://doi.org/10.15252/emj.2021108595>.
- Lin, Y.L., Smith, S.N., Kanso, E., Septer, A.N. & Rycroft, C.H. (2023) A subcellular biochemical model for T6SS dynamics reveals winning competitive strategies. *PNAS Nexus*, 2, pgad195. <https://doi.org/10.1093/pnasnexus/pgad195>.
- Lozupone, C. & Knight, R. (2005) UniFrac: a New Phylogenetic Method for Comparing Microbial Communities. *Applied and Environmental Microbiology*, 71, 8228–8235. <https://doi.org/10.1128/AEM.71.12.8228-8235.2005>.
- Marchi, M., Boutin, M., Gazengel, K., Risper, C., Gauthier, J.-P., Guillermin-Erckelboudt, A.-Y., et al. (2013) Genomic analysis of the biocontrol strain *Pseudomonas fluorescens* Pf29Arp with evidence of T3SS and T6SS gene expression on plant roots. *Environmental Microbiology Reports*, 5, 393–403. <https://doi.org/10/z4h>.

- Martin, B.D., Witten, D. & Willis, A.D. (2020) Modeling microbial abundances and dysbiosis with beta-binomial regression. *The Annals of Applied Statistics*, 14, 94–115. <https://doi.org/10.1214/19-aos1283>.
- Martin, M. (2011) Cutadapt removes adapter sequences from high-throughput sequencing reads. *EMBnet.journal*, 17, 10–12. <https://doi.org/10.14806/ej.17.1.200>.
- McMurdie, P.J. & Holmes, S. (2013) phyloseq: An R package for reproducible interactive analysis and graphics of microbiome census data. *PLOS ONE*, 8, e61217. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0061217>.
- Nelson, E.B. (2004) Microbial dynamics and interactions in the spermosphere. *Annual Review of Phytopathology*, 42, 271–309. <https://doi.org/10/c39mt2>.
- Olofintila, O.E. & Noel, Z.A. (2023) Soybean and Cotton Spermosphere Soil Microbiome Shows Dominance of Soilborne Copiotrophs. *Microbiology Spectrum*, 11, e00377-23. <https://doi.org/10.1128/spectrum.00377-23>.
- Ortega-Cuadros, M., De Souza, T.L., Berruyer, R., Aligon, S., Pelletier, S., Renou, J.-P., et al. (2022) seed transmission of pathogens: non-canonical immune response in *Arabidopsis* germinating seeds compared to early seedlings against the necrotrophic fungus *Alternaria brassicicola*. *Plants*, 11, 1708. <https://doi.org/10.3390/plants11131708>.
- Paradis, E. & Schliep, K. (2019) ape 5.0: an environment for modern phylogenetics and evolutionary analyses in R. *Bioinformatics*, 35, 526–528. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/bty633>.
- Pei, T.-T., Kan, Y., Wang, Z.-H., Tang, M.-X., Li, H., Yan, S., et al. (2022) Delivery of a Rhs-family nuclease effector reveals direct penetration of the gram-positive cell envelope by a type VI secretion system in *Acidovorax citrulli*. *mLife*, 1, 66–78. <https://doi.org/10.1002/mlf2.12007>.
- Pérez-Lorente, A.I., Molina-Santiago, C., Vicente, A. de & Romero, D. (2023) Sporulation activated via σ^W protects *Bacillus* from a Tse1 peptidoglycan hydrolase T6SS effector. *Microbiology Spectrum*, 11, e0504522. <https://doi.org/10.1128/spectrum.05045-22>
- Pukatzki, S., Ma, A.T., Revel, A.T., Sturtevant, D. & Mekalanos, J.J. (2007) Type VI secretion system translocates a phage tail spike-like protein into target cells where it cross-links actin. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 104, 15508–15513. <https://doi.org/10.1073/pnas.0706532104>.
- Rezki, S., Champion, C., Simoneau, P., Jacques, M.-A., Shade, A. & Barret, M. (2018) Assembly of seed-associated microbial communities within and across successive plant generations. *Plant and Soil*, 422, 67–79. <https://doi.org/10/gc2m2s>.
- Robitaille, S., Trus, E. & Ross, B.D. (2021) Bacterial defense against the type VI secretion system. *Trends in Microbiology*, 29, 187–190. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2020.09.001>.
- Rocheftort, A., Simonin, M., Marais, C., Guillerme-Erckelboudt, A.-Y., Barret, M. & Sarniguet, A. (2021) Transmission of seed and soil microbiota to seedling. *mSystems*, 6, e0044621. <https://doi.org/10/gnx97s>.
- Russel, J., Røder, H.L., Madsen, J.S., Burmølle, M. & Sørensen, S.J. (2017) Antagonism correlates with metabolic similarity in diverse bacteria. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 114, 10684–10688. <https://doi.org/10/gb2n4v>.
- Russell, A.B., Wexler, A.G., Harding, B.N., Whitney, J.C., Bohn, A.J., Goo, Y.A., et al. (2014) A Type VI Secretion-Related Pathway in Bacteroidetes Mediates Interbacterial Antagonism. *Cell Host & Microbe*, 16, 227–236. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2014.07.007>.
- Shade, A., Jacques, M.-A. & Barret, M. (2017) Ecological patterns of seed microbiome diversity, transmission, and assembly. *Current Opinion in Microbiology*, 37, 15–22. <https://doi.org/10/gcn64p>.
- Simonin, M., Briand, M., Chesneau, G., Rocheftort, A., Marais, C., Sarniguet, A., et al. (2022) Seed microbiota revealed by a large-scale meta-analysis including 50 plant species. *New Phytologist*, 234, 1448–1463. <https://doi.org/10.1111/nph.18037>.
- Simonin, M., Prévieux, A., Marais, C., Garin, T., Arnault, G., Sarniguet, A., et al. (2023) Transmission of synthetic seed bacterial communities to radish seedlings: impact on microbiota assembly and plant phenotype. *Peer Community Journal*, 3, e95. <https://doi.org/10.24072/pcjournal.329>.

-
- Stamatakis, A. (2014) RAxML version 8: a tool for phylogenetic analysis and post-analysis of large phylogenies. *Bioinformatics (Oxford, England)*, 30, 1312–1313. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btu033>.
- Steinbach, G., Crisan, C., Ng, S.L., Hammer, B.K. & Yunker, P.J. (2020) Accumulation of dead cells from contact killing facilitates coexistence in bacterial biofilms. *Journal of The Royal Society Interface*, 17, 20200486. <https://doi.org/10/gpcjff>.
- Torres-Cortés, G., Bonneau, S., Bouchez, O., Genthon, C., Briand, M., Jacques, M.-A., et al. (2018) Functional microbial features driving community assembly during seed germination and emergence. *Frontiers in Plant Science*, 9, 902. <https://doi.org/10/gk86ft>.
- Walsh, C.M., Becker-Uncapher, I., Carlson, M. & Fierer, N. (2021) Variable influences of soil and seed-associated bacterial communities on the assembly of seedling microbiomes. *The ISME Journal*, 15, 2748–2762. <https://doi.org/10.1038/s41396-021-00967-1>.
- Wang, Q., Garrity, G.M., Tiedje, J.M. & Cole, J.R. (2007) Naïve Bayesian Classifier for Rapid Assignment of rRNA Sequences into the New Bacterial Taxonomy. *Applied and Environmental Microbiology*, 73, 5261–5267. <https://doi.org/10.1128/AEM.00062-07>.
- Wu, M. & Scott, A.J. (2012) Phylogenomic analysis of bacterial and archaeal sequences with AMPHORA2. *Bioinformatics (Oxford, England)*, 28, 1033–1034. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/bts079>.
- Xiong, X., Wan, W., Ding, B., Cai, M., Lu, M. & Liu, W. (2024) Type VI secretion system drives bacterial diversity and functions in multispecies biofilms. *Microbiological Research*, 279, 127570. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2023.127570>.
- Yadav, S.K., Magotra, A., Ghosh, S., Krishnan, A., Pradhan, A., Kumar, R., et al. (2021) Immunity proteins of dual nuclease T6SS effectors function as transcriptional repressors. *EMBO reports*, 22, e51857. <https://doi.org/10/gpcjg2>.
- Yang, L., Danzberger, J., Schöler, A., Schröder, P., Schlöter, M. & Radl, V. (2017) Dominant groups of potentially active bacteria shared by barley seeds become less abundant in root associated microbiome. *Frontiers in Plant Science*, 8, 1005. <https://doi.org/10.3389/fpls.2017.01005>
- Zhang, J., Guan, J., Wang, M., Li, G., Djordjevic, M., Tai, C., et al. (2023) SecReT6 update: a comprehensive resource of bacterial Type VI Secretion Systems. *Science China Life Sciences*, 66, 626–634. <https://doi.org/10.1007/s11427-022-2172-x>.

SUPPLEMENTARY DATA

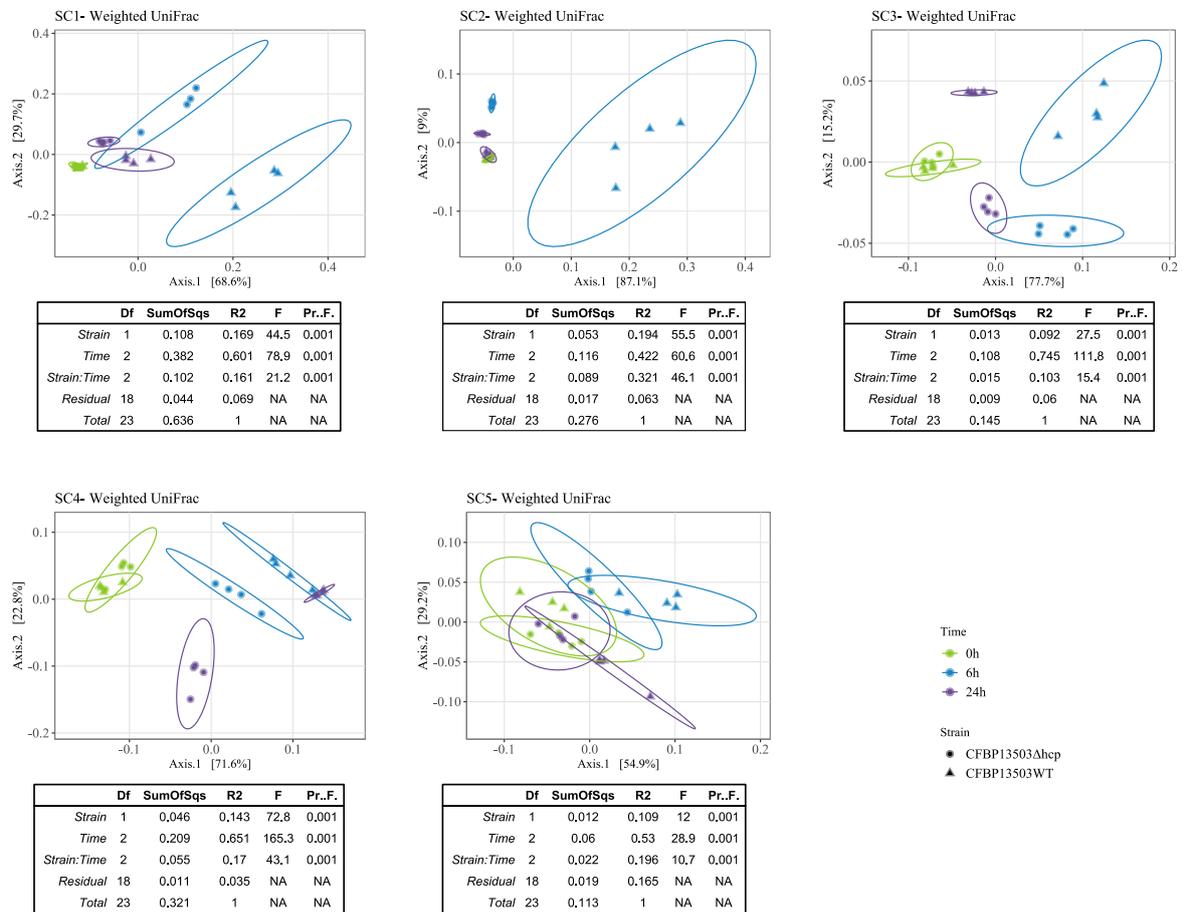


Figure S1. Impact of CFBP13503 T6SS and time on bacterial communities' dynamics. The figure displays the β -diversity and Adonis (permutational multivariate analysis of variance) results depicting the compositional differences in bacterial communities among different conditions (WT vs. Δhcp) and time points (0h, 6h and 24h).

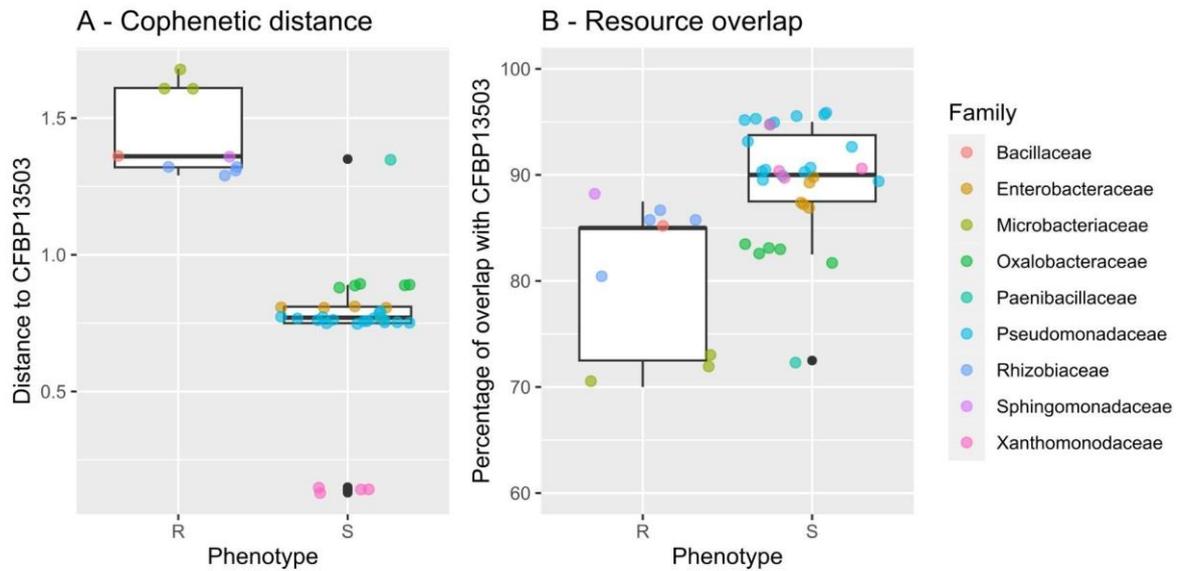


Figure S2. Changes in strain relative abundance according to their phylogenetic (A) and functional (B) proximity from *S. rhizophila* CFBP13503. (A) Pairwise phylogenetic distances (cophenetic distances) between *S. rhizophila* CFBP13503 and each SynCom members. (B) Predicted resource overlap (based on microtrait - level of granularity 3). R: strains enriched after 6 h of confrontation with CFBP13503. S: strains depleted after 6 h of confrontation with CFBP13503.

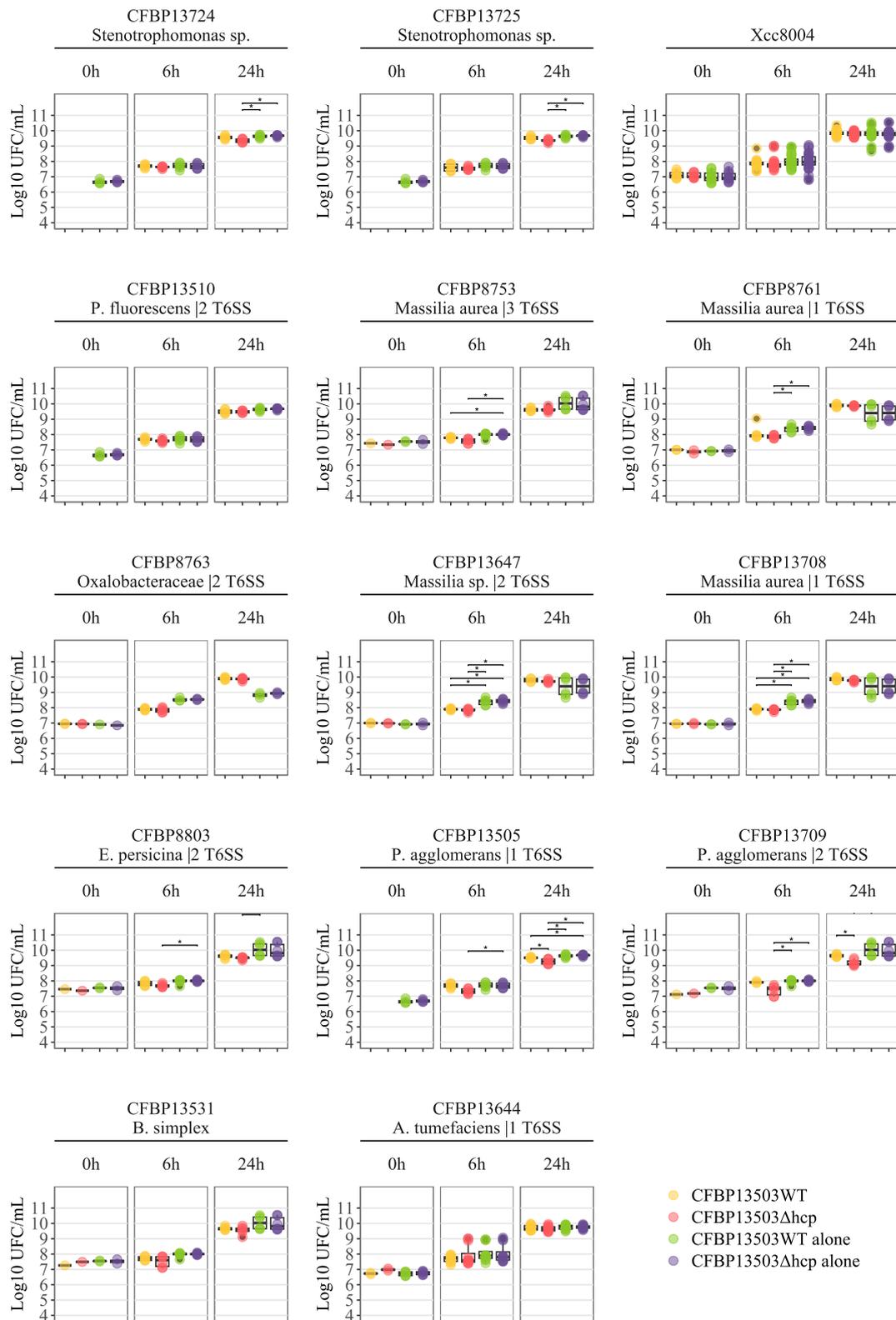


Figure S3. *S. rhizophila* CFBP13503 population dynamics during pairwise confrontation assays. Colony-forming units (CFU) of CFBP13503 populations were quantified on TSA10 supplemented with ampicillin-streptomycin. Six or 18 (CFBP13503 alone) replicates are plotted. Statistical analyses were performed using Wilcoxon-Mann-Whitney Test (* p-value < 0.05; ** p-value < 0.005).

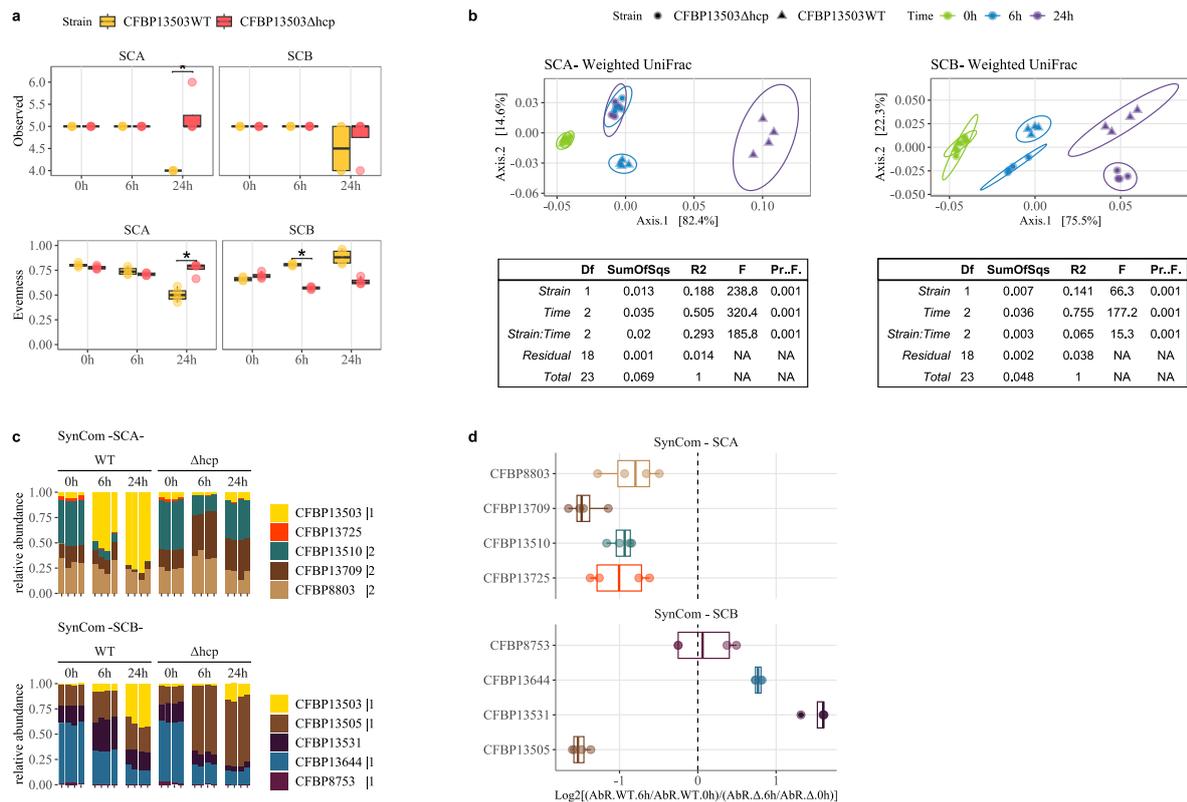


Figure S4. *S. rhizophila* CFBP13503 T6SS impact on synthetic communities of 5 members *in vitro*. (a) Richness and evenness of bacterial communities during confrontations with *S. rhizophila* CFBP13503 wild type (WT) and the T6SS mutant Δhcp at different time points (0h, 6h and 24h). Statistical analysis was performed using Dunn's Multiple Comparison Test (* p-value < 0.05). (b) β -diversity and Adonis (permutational multivariate analysis of variance) results depicting the compositional differences in bacterial communities among different conditions (WT vs. Δhcp) and time points (0h, 6h and 24h). (c) Relative abundance of bacterial taxa within the two synthetic communities at different confrontation times (0h, 6h, and 24h) while competing with the wild-type strain of *S. rhizophila* CFBP13503 (WT) or the T6SS-deficient mutant Δhcp . (d) Relative abundance variation ratio between 0 hours and 6 hours in the WT condition compared to the Δhcp condition. Bacterial taxa are color-coded based on their respective families. The presence and number of T6SS in each bacterial taxon are represented by an asterisk (*).

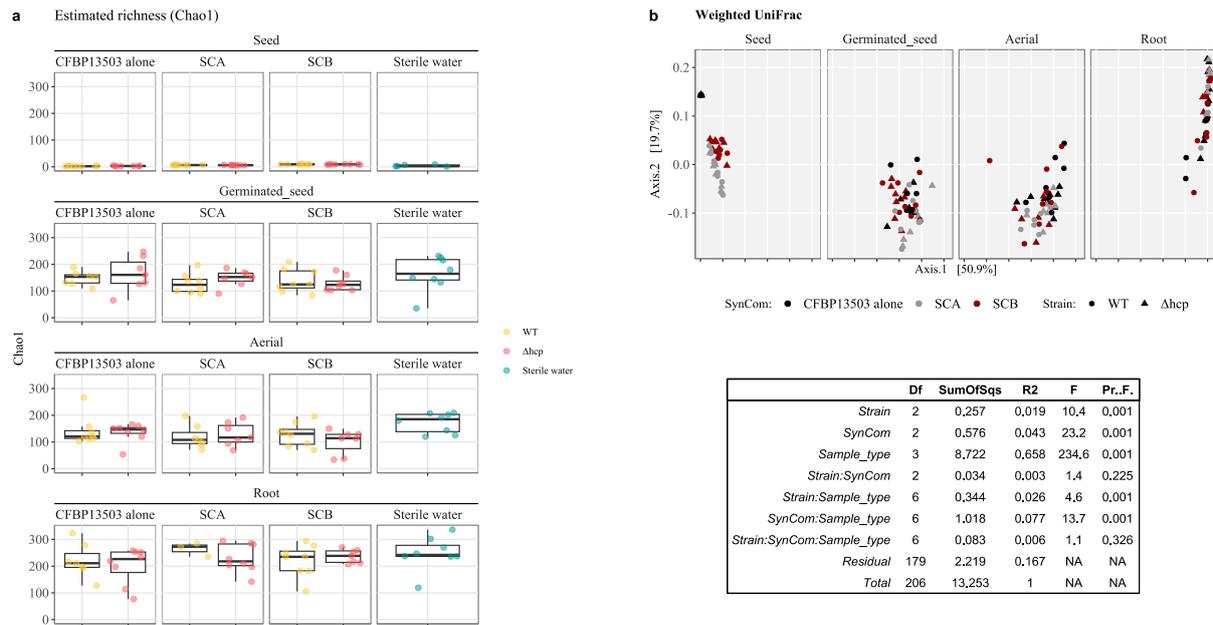


Figure S5. Estimate richness and β -diversity of bacterial communities during seed-to-seedling transmission. (a) Box plots showing α -diversity (Chao1 estimator) of bacterial communities in the different compartment for the different SynCom (sterile water condition included). **(b)** Weighted UniFrac measures of β -diversity visualized using Principal Coordinate Analysis (PCoA) following individual samples over the different plant compartment (Sample_type). Color and shape are based on SynCom and CFBP13503 competitors (strain) respectively. Table shows adonis (Permanova) results.

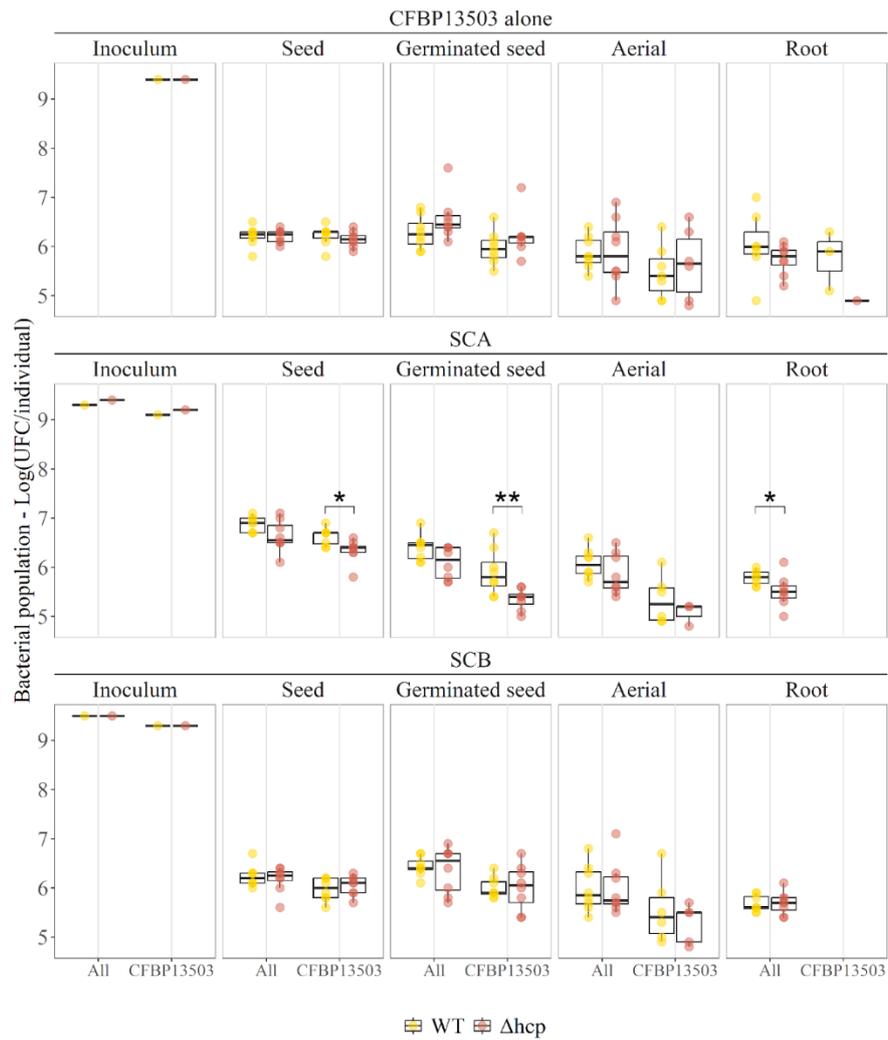


Figure S6. Bacterial populations during seed-to-seedling transmission. Total bacterial (All) and *S. rhizophila* CFBP13503 (CFBP13503) population were enumerated on non-selective (TSA10) and selective (TSA10+Spe⁵⁰+Amp¹⁰⁰) media respectively. The colors represent the inoculated *S. rhizophila* CFBP13503 strain: WT (yellow) and Δhcp (red). Statistical analyses were performed using Wilcoxon-Mann-Whitney Test (* p-value < 0.05; ** p-value < 0.005).

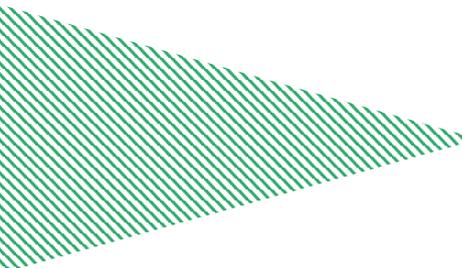
IV. Conclusions

Les T6SS sont très prévalents chez les bactéries associées aux graines. Ce résultat conforte notre hypothèse que les T6SS pourraient conférer un avantage compétitif aux bactéries lors de l'assemblage du microbiote des graines et sa transmission à la plantule.

Les compétitions inter-bactériennes médiées par le T6SS de *S. rhizophila* CFBP13503 démontrent un fort impact sur la structuration des communautés bactériennes synthétiques *in vitro*. Ceci est vrai, peu importe la diversité phylogénétique et le nombre de compétiteurs possédant un ou plusieurs T6SS. Ce fort impact sur la dynamique de structuration des communautés est expliqué par le fait que *S. rhizophila* CFBP13503 est capable de tuer un large spectre de cibles grâce à son T6SS et qu'elle semble résister aux attaques des autres compétiteurs qui en possède. Les résultats révèlent également que les bactéries proches phylogénétiquement et métaboliquement de *S. rhizophila* CFBP13503 sont sensibles à l'attaque de son T6SS contrairement aux bactéries plus éloignées.

Les compétitions inter-bactériennes médiées par le T6SS de *S. rhizophila* CFBP13503 ont très peu d'impact sur la structuration des communautés bactériennes lors de la transition graine – plantule mais démontrent un impact significatif sur l'abondance relative de certains taxons bactériens spécifiques. La plupart de ces taxons sont positivement ou négativement impactés par la présence du T6SS de *S. rhizophila* CFBP13503 dès le stade des graines en germination. D'autres, voient leur abondance relative impactée plus tardivement au stade plantule, démontrant que l'impact du T6SS persiste au cours du temps lors de l'assemblage du microbiote des plantes.

Finalement, l'avantage compétitif de *S. rhizophila* CFBP13503, conféré par son T6SS, dépend de la sensibilité des bactéries co-inoculées sur graines. Le T6SS fonctionnel augmente la population *S. rhizophila* CFBP13503 au niveau des plantules lorsque la SynCom co-inoculée est composée de bactéries sensibles au T6SS, ce qui n'est pas le cas lorsque la SynCom est composée de bactéries résistantes.



DISCUSSION & PERSPECTIVES

I. Distribution des T6SS dans le genre *Stenotrophomonas*

Les T6SS sont très peu présents au sein du genre *Stenotrophomonas* avec seulement 8.3% des génomes analysés (n=835) codant pour au moins un T6SS (**chapitre 1**). A titre de comparaison, 75% des génomes complets de *Xanthomonas* disponibles (n=1740) possèdent au moins un T6SS (Liyanapathiranage et al., 2022). Bien sûr, ces pourcentages sont biaisés par le nombre de génomes disponibles par espèce et la conservation des T6SS au sein de ces espèces. Pour être un peu plus précise, 60% des espèces (n=38) de *Xanthomonas* analysées contiennent des souches possédant au moins un T6SS et dans la majorité de ces espèces, les T6SS sont conservés entre les membres (Liyanapathiranage et al., 2022). Chez le genre *Acinetobacter*, la fréquence des espèces possédant un T6SS (n=42) avoisine les 80% (Repizo et al., 2019).

Les T6SS des *Stenotrophomonas* appartiennent aux groupes i1, i3 et i4b (Crisan et al., 2023; Garin et al., 2024). Les groupes i3 et i4b sont détectés chez plusieurs espèces de Lysobacterales (Bayer-Santos et al., 2019). En implémentant les données de Bayer-Santos avec celles des *Stenotrophomonas*, nous avons identifié un nouveau sous-groupe parmi les T6SS du groupe i3 (i3****) qui semble spécifique de ce genre. Sur les 13 génomes de *Stenotrophomonas* codant un T6SS i3****, 11 codent également un T6SS i4b. La co-occurrence des T6SS i3 et T6SS i4b est également observée et conservée chez les souches appartenant aux espèces *X. oryzae*, *X. citri* et *X. translucens* (Liyanapathiranage et al., 2022). La dispersion des clusters T6SS au sein du genre *Stenotrophomonas* et des groupes d'espèces suggère une divergence dans l'évolution des T6SS au sein de ces groupes, avec des événements d'acquisition, de conservation, et éventuellement de perte, contribuant à la diversité observée. Nos analyses montrent toutefois certaines limites pour comprendre au mieux l'histoire évolutive des T6SS au sein des *Stenotrophomonas*. Dans notre étude, nous avons considéré les bactéries porteuses d'un T6SS si celles-ci possèdent l'ensemble des gènes structuraux (Néron et al., 2023). Or, les T6SS peuvent être sujets à des mutations ou des pertes de gènes (Cummins et al., 2023; García-Bayona et al., 2021; Liyanapathiranage et al., 2022). Au niveau des *Xanthomonas* par exemple, 817 clusters incomplets ont été détectés parmi les 1740 génomes analysés (Liyanapathiranage et al., 2022). La détection des T6SS incomplets au niveau des *Stenotrophomonas* nous permettrait d'en apprendre davantage sur l'histoire évolutive de ces systèmes au sein du genre.

Mais pourquoi les bactéries perdent la fonctionnalité de leur T6SS et pourquoi les *Stenotrophomonas* pourraient être concernées ?

Il a récemment été montré que de nombreux clades d'*E. coli* contenant des souches multirésistantes aux antibiotiques avaient perdu des gènes structuraux de leurs T6SS (Cummins et al., 2023). Chez deux séquences types d'*E. coli* (ST410 et ST131), la perte de T6SS coïncide d'ailleurs avec l'apparition de la multirésistance (Cummins et al., 2023). Comme il a été suggéré que l'acquisition de plasmides à résistances multiples pouvait jouer un rôle important dans l'évolution des clones d'*E. coli* pandémiques, les auteurs ont alors fait l'hypothèse que la perte du T6SS permettrait de favoriser le contact entre les cellules, contact nécessaire au transfert conjugatif des plasmides (Cummins et al., 2023). La conjugaison fait intervenir le système de sécrétion de type IV (T4SS), qui peut également être impliqué dans l'acquisition et le relargage d'ADN au niveau du milieu extérieur ou encore la sécrétion d'effecteurs (Cascales and Christie, 2003). Lors du processus de conjugaison, le pilus conjugatif déstabilise les membranes de la souche receveuse dans le but d'y former un canal permettant le passage de l'ADN. Chez *P. aeruginosa*, cette déstabilisation entraîne une contre-attaque de la part de son H1-T6SS (i3) (Ho et al., 2013). Pour *A. baumannii*, c'est le contact nécessaire au transfert qui entraîne la mort des cellules donneuses par son T6SS (i4) exprimé de manière constitutive (Di Venanzio et al., 2019). Certaines souches multirésistantes d'*A. baumannii* ont également perdu des gènes de leur T6SS (Di Venanzio et al., 2019; Jones et al., 2015; Kim et al., 2017). D'autres, en revanche, ont surmonté cette interférence et arborent des mégaplasmides conjugatifs qui contiennent des gènes de régulation qui répriment leur T6SS (Weber et al., 2015). Cette répression permet aux mégaplasmides de se propager et permet également la conjugaison d'autres plasmides par l'intermédiaire du T4SS (Weber et al., 2015). Ce cas est un des rares exemples où la présence de T6SS exprimé constitutivement, comme les i4b, et la conjugaison de plasmides ne sont pas antinomiques. Une analyse préliminaire de 35 génomes de Xanthomonadales a révélé que le T6SS i4b est la plupart du temps détecté dans des génomes qui n'ont pas de T4SS (comm. Pers. Peduzzi et al., 2023). Au niveau des *Stenotrophomonas spp.*, le T4SS est également très peu fréquent chez les bactéries porteuses d'un T6SS et sont plutôt détectés chez des bactéries porteuses d'un T6SS du groupe i1 qui sont peu nombreuses au sein du genre (Crisan et al., 2023). La plupart des *Stenotrophomonas spp.* étant multirésistantes aux antibiotiques (Kunz Coyne et al., 2023; Wang et al., 2018), il n'est donc pas à exclure que les T6SS aient pu être

contre-sélectionnés chez ces bactéries pour favoriser les transferts horizontaux de gènes de résistance par conjugaison.

Une autre raison pouvant expliquer la faible prévalence des T6SS chez les *Stenotrophomonas* serait associée à leur capacité à produire de nombreux métabolites secondaires aux propriétés antimicrobiennes (Berg et al., 2010; Reyes-Perez et al., 2019; Trifonova and Strateva, 2019; Vespermann et al., 2007). Posséder un T6SS pourrait ne pas leur apporter d'avantage sélectif. Il serait intéressant d'établir des corrélations entre la présence des T6SS et celle des clusters de métabolites secondaires par des approches de génomique comparée.

II. Le T6SS de *S. rhizophila* CFBP13503

L'étude présentée dans le **chapitre 1** est la première à décrire la distribution et à caractériser un cluster T6SS chez l'espèce *S. rhizophila*. Nos résultats ont mis en évidence que tous les génomes de *S. rhizophila* disponibles sur les bases de données du NCBI codent pour un cluster T6SS du groupe i4b. La conservation des clusters i4b au sein de cette espèce, qui comporte des souches isolées de différents compartiments de la plante (Y., Liu et al., 2022; Minkwitz and Berg, 2001; Torres-Cortés et al., 2019; Wolf et al., 2002), soutient notre hypothèse initiale d'un rôle potentiel de ces systèmes pour la persistance de ces bactéries au sein de ces habitats.

Les gènes codant les protéines structurales du T6SS de *S. rhizophila* CFBP13503 sont divisés en deux clusters séparés par une région de plusieurs kilobases, comme observé pour les T6SS i4b d'autres bactéries appartenant à l'ordre des Lysobacterales (Bayer-Santos et al., 2019). La structure génomique du T6SS de *S. rhizophila* CFBP13503 est très similaire à celle du cluster i4b décrit récemment chez la souche STEN0024 isolée de voie respiratoire humaine et appartenant au complexe d'espèces *S. maltophilia* (Crisan et al., 2023). L'organisation des gènes *vgrG* et *paar* est également similaire entre ces deux souches bactériennes avec des gènes *vgrG* positionnés de manière similaire au niveau du cluster principal, et des gènes *vgrG* et *paar* orphelins dispersés au sein de leur génome (**Chapitre 1, Fig. 1** ; Crisan et al., 2023). Cependant, les activités potentielles des effecteurs ou des domaines toxiques associés aux gènes *vgrG* et *paar* diffèrent entre les deux bactéries. La similarité dans la distribution des gènes T6SS suggère des événements d'acquisition analogues entre ces deux souches bactériennes, ce qui renforce davantage l'intérêt de mener des analyses de génomique comparative entre les différentes

espèces de *Stenotrophomonas* afin de mieux comprendre l'histoire évolutive des T6SS au sein de ce genre.

S. rhizophila CFBP13503 possède 9 effecteurs potentiels (**chapitre 1**). Cinq d'entre eux sont associés à des gènes *vgrG* présents au niveau du cluster principal. Deux autres sont codés en aval de gènes *vgrG* orphelins et les deux derniers sont identifiés comme des effecteurs PAAR spécialisés orphelins de type PAAR-Rhs-CT. Les activités potentielles de certains de ces effecteurs ont pu être identifiées grâce à la recherche de domaines conservés (Jurénas and Journet, 2021). *S. rhizophila* CFBP13503 possède ainsi deux effecteurs de type lipase (Tle), un effecteur de type muramidase (Tae), deux effecteurs PAAR-Rhs-CT de type DNase (Tde) et un effecteur structurellement similaire à la toxine formeuse de pores VasX (Tme). Les activités potentielles des trois derniers effecteurs n'ont pas pu être prédites.

Les activités prédites des effecteurs identifiés suggèrent que le T6SS de *S. rhizophila* CFBP13503 est capable de cibler de nombreux composants cellulaires bactériens : les membranes (Tle, Tme), le peptidoglycane (Tae) et l'ADN (Tde) (Jurénas and Journet, 2021). Si l'activité antibactérienne du T6SS de *S. rhizophila* CFBP13503 a été démontrée à de multiples reprises au cours de ce travail de thèse (**chapitre 1 ; chapitre 2**), des cellules eucaryotes pourraient également être la cible de ce système de sécrétion. En effet, six de ses sept VgrG contiennent un domaine DUF2345 qui peut être impliqué dans la toxicité envers les levures comme démontré pour le VgrG4 de *Klebsiella pneumoniae* (Storey et al., 2020). De plus, les deux effecteurs orphelins de type PAAR-Rhs-CT (Tde) partagent des homologies de séquence avec l'effecteur TafE d'*A. baumannii* ATCC 17978, une DNase impliquée dans l'antibiose envers les levures *S. cerevisiae*, *C. albicans* et *C. glabrata* (Luo et al., 2023). *S. rhizophila* CFBP13503 possède également deux effecteurs de type lipase pouvant avoir une activité interrègne chez *P. aeruginosa* (Jiang et al., 2014; Jiang et al., 2016). Dans ce projet de thèse, nous avons évalué l'activité antifongique du T6SS de *S. rhizophila* CFBP13503 par des dispositifs de confrontation avec différentes souches de *S. cerevisiae*. Ces tests préliminaires n'ont pas permis de mettre en évidence une antibiose du T6SS de CFBP13503 vis-à-vis des souches testées. Avant de conclure définitivement à une absence d'activité antifongique, ces tests devront être reproduits en modulant les conditions d'inoculation qui étaient adaptées aux compétitions interbactériennes (milieu de culture et ratio cellulaire entre proie et prédateur).

III. L'activité antimicrobienne du T6SS de *S. rhizophila* CFBP13503

Le T6SS de *S. rhizophila* CFBP13503 est impliqué dans l'antibiose d'une large diversité d'espèces bactériennes appartenant aux familles des *Xanthomonadaceae*, *Pseudomonadaceae*, *Oxalobacteraceae*, *Enterobacteraceae* et *Erwiniaceae* (**chapitre 2, Fig. 4b**). Cette diversité de cibles n'est pas unique à *S. rhizophila* CFBP13503. D'autres T6SS, comme ceux de *P. putida* KT2440 et *Paraburkholderia sabiae* LMG24235, ciblent également un large éventail d'espèces. (Bernal et al., 2017; Hug et al., 2023). Par exemple, les T6SS de *P. putida* KT2440 sont impliqués dans l'antibiose de *X. campestris* (*Xanthomonadaceae*), *A. tumefaciens* (*Rhizobiaceae*), *P. carotovorum* (*Enterobacteraceae*) et *P. syringae* (*Pseudomonadaceae*) (Bernal et al., 2017). Le T6SS-3 de *P. sabiae* LMG24235 est impliqué dans l'inhibition de la croissance de souches appartenant aux familles des *Burkholderiaceae*, *Pseudomonadaceae* et *Enterobacteriaceae* (Hug et al., 2023). Ces deux souches bactériennes, comme *S. rhizophila* CFBP13503, possèdent de nombreux effecteurs potentiels avec des activités très diverses. Chez *P. putida* KT2440, dix effecteurs potentiels ont été détectés dont des nucléases (Tde), des colicines formant des pores (Tme) et une NAD(P)(+) glycohydrolase (Tne) (Bernal et al., 2017). Chez *P. sabiae* LMG24235, 8 *vgrG* ont été détectés, chacun associé à un effecteur potentiel ayant par exemple une activité lipase (Tle), peptidoglycane hydrolase (Tge) ou nucléase (Tde) (Hug et al., 2023). Le grand nombre d'effecteurs de *P. putida* KT2440, *P. sabiae* LMG24235 et *S. rhizophila* CFBP13503, ainsi que la diversité de leurs activités pourraient expliquer le large spectre de cible chez ces bactéries. En effet, la toxicité des effecteurs est variable en fonction de leur activité et de la dose injectée (Rudzite et al., 2023). De plus, certains effecteurs peuvent agir en synergie pour augmenter leur efficacité (LaCourse et al., 2018). Finalement, bien que les bactéries puissent utiliser des défenses non immunitaires contre l'attaque des T6SS (**voir synthèse bibliographique section III.5**), posséder les protéines d'immunité associées aux effecteurs reste la meilleure défense face à leurs activités. En possédant une grande variété d'effecteurs, les bactéries augmentent donc leurs chances de pouvoir éliminer leurs compétiteurs. De plus, en possédant les protéines d'immunité associées à des effecteurs très variés, les bactéries augmentent également leur chance de pouvoir résister à l'attaque des T6SS de leurs compétiteurs. Ceci pourrait par exemple expliquer pourquoi les populations de *S. rhizophila* CFBP13503 ne sont pas impactées lorsque la souche est confrontée à des compétiteurs

possédants des T6SS (**chapitre 2, Fig. S3**). Cependant, il n'est pas certain que les protéines d'immunité puissent protéger des effecteurs produits par d'autres bactéries.

Chez *Serratia* par exemple, plusieurs souches bactériennes possèdent des effecteurs de type PAAR-Rhs-CT contenant un domaine NADase. Bien que les effecteurs aient la même activité, les domaines toxiques ne sont pas homologues et requièrent l'activité de leur protéine d'immunité respective pour être inactivés (Hagan et al., 2023). L'absence d'impact des compétiteurs T6SS sur les populations de *S. rhizophila* CFBP13503 pourrait également être expliqué par le fait que les T6SS sont des mécanismes très finement régulés (Hespanhol et al., 2023) et qu'il n'est pas certain que les souches bactériennes testées dans notre étude expriment leurs T6SS dans les conditions expérimentales utilisées. Cependant, si les bactéries expriment bien leur T6SS, une autre explication pourrait concerner la dynamique d'assemblage du T6SS de *S. rhizophila* CFBP3503 et sa régulation spatio-temporelle. Il existe plusieurs stratégies d'assemblage des T6SS (J., Wang et al., 2019). Si *V. cholerae* assemble plusieurs T6SS (i1) aléatoirement au niveau de ses membranes (Basler and Mekalanos, 2012), le H3-T6SS (i3) de *P. aeruginosa* PAO1 est quant à lui assemblé en réponse à des attaques (Basler et al., 2013). Au niveau du cluster T6SS de *S. rhizophila* CFBP13503, nous avons détecté la présence d'un gène codant la protéine spécifique du groupe i4b, TslA. Cette protéine permet de réguler spatialement l'assemblage du T6SS au point de contact entre les cellules chez *A. baylyi*, *A. baumannii* et *B. thailandensis* (Lin et al., 2022). Chez *A. baylyi*, un tiers des T6SS sont assemblés au point de contact grâce à l'intervention de TslA tandis que les deux autres tiers s'assemblent de manière aléatoire (Lin et al., 2022). En comparant ces différentes stratégies d'assemblage (aléatoire ou point de contact) par des approches de modélisations, Smith et al. ont mis en évidence que la stratégie au point de contact était très efficace car elle limitait les tirs à blanc. D'un autre côté, la stratégie d'assemblage aléatoire pouvait conférer un avantage compétitif, car les bactéries étaient déjà armées avant d'être en contact et tiraient donc plus rapidement (Smith et al., 2020a). Ainsi, si *S. rhizophila* CFBP13503 possède les deux stratégies (assemblage au point de contact et assemblage aléatoire), comme observé chez *A. baylyi*, elle pourrait être une bactérie extrêmement compétitive, potentiellement capable d'utiliser son T6SS de manière plus efficace que ses compétiteurs. Nous manquons encore d'informations sur la manière dont *S. rhizophila* CFBP13503 exploite son T6SS. Combien de T6SS assemble-t-elle simultanément ? Quel est son taux de tir ? Est-ce qu'elle assemble ses T6SS de manière aléatoire, au point de contact avec les cellules cibles, ou les deux ? Pour répondre à ces

questions, il serait nécessaire de créer une fusion traductionnelle TssB-sfGFP pour visualiser le T6SS de *S. rhizophila* CFBP13503 *via* la microscopie à épifluorescence. Cela permettrait alors d'estimer le temps d'assemblage et de désassemblage de ses T6SS, le nombre qu'elle peut en assembler simultanément, leur emplacement, et son taux de tir (nombre de T6SS par unité de temps). Il a en effet été montré que plus une bactérie assemble ses T6SS et tire rapidement, plus elle est compétitive (Lin et al., 2023).

IV. L'impact du T6SS de *S. rhizophila* CFBP13503 sur la structuration des communautés bactériennes *in vitro*

Dans le **chapitre 2** de cette thèse, nous avons comme objectif d'évaluer l'impact des compétitions inter-microbiennes médiées par le T6SS de *S. rhizophila* CFBP13503 sur la structuration de communautés bactériennes. Pour ce faire, nous avons mené des tests de confrontation *in vitro* entre *S. rhizophila* CFBP13503 (WT ou Δ T6SS) et 5 communautés bactériennes synthétiques (SynComs), composées chacune de 10 bactéries. Les bactéries sélectionnées ont toutes été isolées de graine de *Brassicaceae* et représentent 9 familles bactériennes distinctes. Lors de la construction des SynComs, nous avons fait varier la distance phylogénétique et le nombre de compétiteurs T6SS. Nous savions en effet que construire des communautés constituées exclusivement de bactéries très proches phylogénétiquement pouvaient entraîner de fortes compétitions pour les ressources puisque la proximité phylogénétique est corrélée à la proximité métabolique (Russel et al., 2017). Il nous semblait également important d'ajouter et de faire varier les compétiteurs T6SS car, dans son environnement naturel (graine et plante), *S. rhizophila* CFBP13503 rencontre probablement beaucoup de compétiteurs de ce type. En effet, comme nous l'avons montré dans le chapitre 2, les T6SS sont très prévalents chez les bactéries associées aux graines avec 62% des génomes analysés (n=180) codant pour au moins un cluster T6SS complet.

Ainsi, nos résultats ont révélé que le T6SS de *S. rhizophila* CFBP13503 avaient un fort impact sur la structuration des communautés bactériennes synthétiques *in vitro* et ce dès 6h de confrontation. En impactant précocement les taxons sensibles à son T6SS, *S. rhizophila* CFBP13503 modifie complètement la dynamique d'assemblage des communautés au cours du temps.

Ces résultats font partie des premiers à décrire l'impact d'un T6SS sur la structuration de communautés bactériennes *in vitro*. A ma connaissance, une seule autre étude a examiné ce type d'impact en évaluant l'impact du T6SS (i4b) de *P. putida* KT2440 sur la structuration de biofilms bactériens multi-espèce composée de bactéries telluriques (Xiong et al., 2024). De la même manière, ils ont observé un fort impact du T6SS de *P. putida* KT2440 sur la structuration des communautés microbiennes (Xiong et al., 2024).

Notre étude ainsi que celle de Xiong et al. nous indiquent donc que les T6SS ont un fort pouvoir structurant sur les communautés bactériennes, qu'elles soient composées de bactéries isolées de graines ou de sol. Ces résultats confortent notre hypothèse de départ que le T6SS pourrait jouer un rôle dans la dynamique de transmission du microbiote des graines lors de la transition graine-plantules lorsque qu'il y a une coalescence entre les communautés microbiennes associées aux graines et les communautés microbiennes associées au sol.

V. Un lien entre compétitions d'interférence médiées par le T6SS et exploitation des ressources ?

Lors des tests de confrontations en SynCom du chapitre 2, nous avons observé que les souches appartenant aux familles des *Rhizobiaceae*, *Bacillaceae*, *Spingomonadaceae* et *Microbacteriaceae* étaient enrichies en présence du T6SS de *S. rhizophila* CFBP13503, tandis que celles appartenant aux familles des *Pseudomonadaceae*, *Xanthomonadaceae*, *Erwiniaceae*, *Enterobacteraceae* et *Peanibacillaceae* étaient appauvries (**chapitre 2, Fig. 4a**). Ayant accès aux génomes des bactéries testées, nous avons pu prédire les voies d'acquisition des ressources par des approches de bioinformatique pour chacune d'entre elles. Nous avons alors mis en évidence que les bactéries partageant une proximité phylogénétique et métabolique avec *S. rhizophila* CFBP13503 sont plus susceptibles d'être négativement impactées par l'activité de son T6SS.

Des résultats similaires ont été obtenus dans l'étude de Xiong et al. portant sur l'impact du K1-T6SS (i4b) de *P. putida* KT2440 sur la structuration de biofilms multi-espèces. Les auteurs ont en effet mis en évidence une corrélation entre la diminution de l'abondance relative de certains taxons (en présence du T6SS) et la proximité métabolique qu'ils partagent avec *P. putida* KT2440. Leurs résultats suggèrent donc que l'activité antimicrobienne des T6SS est corrélée à

la similarité métabolique entre les espèces, ce qui est cohérent avec les résultats de notre étude. Paradoxalement, l'étude de Xiong et al. a aussi révélé une corrélation négative, où certains taxons métaboliquement proches de *P. putida* KT2440 semblent bénéficier de la présence de son T6SS (Xiong et al., 2024). Cette augmentation inattendue de leur abondance peut être expliquée par un effet indirect du T6SS : en éliminant des compétiteurs qui occupent des niches écologiques similaires, *P. putida* KT2440 pourrait favoriser des taxons résistants et métaboliquement proches. Par ailleurs, la relation entre sensibilité au T6SS et proximité phylogénétique n'est pas systématiquement observée. Chez l'espèce *P. agglomerans*, l'impact des compétitions intraspécifiques médiées par les T6SS dépend plutôt des couples effecteurs/immunité présents chez les bactéries (Ripcke et al., 2023). En d'autres termes si une proie phylogénétiquement proche d'un prédateur possède des couples effecteurs/immunité identiques à la souche étudiée sa croissance ne sera pas impactée. Cette observation pourrait expliquer l'acquisition de nouveaux effecteurs chez les bactéries. Chez *P. aeruginosa* par exemple, seuls les effecteurs accessoires (non conservés au sein de cette espèce) participent à la compétition intraspécifique (Habich et al., 2022).

Au sein de notre modèle d'étude, il semblerait que le recouvrement métabolique soit corrélé positivement aux compétitions inter-microbiennes médiées par les T6SS de manière similaire à ce qui est proposé pour les mécanismes d'antagonismes indépendants du contact (Russel et al., 2017). Ces résultats renforcent donc notre hypothèse selon laquelle les T6SS pourraient jouer un rôle lors de la transmission des microorganismes de la graine à la plantule lorsque les compétitions pour les ressources sont intenses (Barret et al., 2015; Nelson, 2004; Olofintila and Noel, 2023; Torres-Cortés et al., 2019).

VI. Le T6SS de *S. rhizophila* CFBP13503 limite la transmission de *X. campestris* pv. *campestris* 8004 de la graine à la plantule de radis

L'un des principaux objectifs de ce projet de thèse était d'évaluer si le T6SS, grâce à ses activités antimicrobiennes, pouvait limiter la transmission des agents phytopathogènes de la graine à la plantule. Pour ce faire, nous avons étudié l'impact du T6SS de *S. rhizophila* CFBP13503 sur la transmission de l'agent phytopathogène *X. campestris* pv. *campestris* 8004 (Xcc800) au niveau des plantules de radis (**chapitre 1**).

En co-inoculant Xcc8004 et les souches de *S. rhizophila* CFBP13503 (sauvage ou Δ T6SS) au niveau de graines de radis et en suivant leurs populations lors de leur transmission, nous avons mis en évidence que le T6SS de *S. rhizophila* CFBP13503 pouvait limiter la transmission de Xcc8004 aux plantules. L'impact du T6SS sur les populations de Xcc8004 est détectable dès le stade des graines germées révélant un impact précoce du T6SS de *S. rhizophila* CFBP13503 sur les populations de l'agent phytopathogène. Cet impact perdure ensuite au niveau des plantules, que ce soit au niveau des parties aériennes ou racinaires. Ces résultats confirment donc que les compétition inter-bactériennes médiées par les T6SS peuvent limiter la transmission des agents phytopathogènes des graines aux plantules.

Il est à noter que ces tests ont été fait en conditions gnotobiotiques en l'absence de communautés microbiennes associées aux graines ou de communautés microbiennes telluriques. Est-ce qu'un impact du T6SS de *S. rhizophila* CFBP13503 sur les populations de Xcc8004 serait encore observable si le nombre et la diversité de compétiteurs étaient plus importants ? Pour répondre à cette question il serait intéressant d'inoculer Xcc8004 et *S. rhizophila* CFBP13503 avec d'autres microorganismes pour diversifier les communautés microbiennes associées aux graines. Des tests en sol non stérile serait également pertinents pour évaluer si la coalescence entre les communautés microbiennes associées aux graines et celles associées au sol peuvent limiter ou au contraire améliorer l'impact du T6SS de *S. rhizophila* CFBP13503 sur la transmission de Xcc8004.

VII. L'impact du T6SS sur la transmission du microbiote des graines et l'invasion des bactéries telluriques

Dans ce projet de thèse, nous avons formulé l'hypothèse que les activités antimicrobiennes des T6SS pourraient conférer un avantage compétitif aux bactéries productrices lors de la transition graine-plantule et que ces activités pourraient également influencer la dynamique de transmission des microorganismes. Après avoir démontré l'activité antimicrobienne et le fort impact du T6SS de *S. rhizophila* CFBP13503 sur la structuration des communautés bactériennes synthétiques *in vitro*, notre dernier objectif a été d'évaluer si les compétitions inter-microbiennes médiées par le T6SS de *S. rhizophila* CFBP13503 pouvaient impacter la dynamique de transmission du microbiote des graines aux plantules. Pour ce faire, nous avons

inoculé des graines de radis avec des communautés bactériennes synthétiques. Cette méthode avait pour objectif d'uniformiser le microbiote initial des graines et de tester si les variations dans la composition de ce microbiote pouvaient affecter l'effet du T6SS. Nous avons mené les tests de transmission en sol non stérile afin d'évaluer l'impact des compétitions inter-microbiennes médiées par le T6SS sur l'invasion des microorganismes telluriques lors de la transition graine-plantule.

1. L'utilisation des SynComs pour réussir à normaliser la transmission du microbiote des graines

Le microbiote des graines a deux propriétés importantes : sa biomasse bactérienne est faible (10^2 à 10^3 cellules par graine) et sa composition taxonomique est très variable entre les graines (Chesneau et al., 2022). Ces deux propriétés peuvent néanmoins être modulées par l'inoculation de SynComs en traitement post-récolte (Arnault et al., 2024; Simonin et al., 2023). L'inoculation de SynComs composées de taxons connus et séquencés permet la détection des souches inoculées tout au long des différents stades de développement de la plante. Ceci est avantageux lorsqu'on veut évaluer l'impact d'un mécanisme microbien comme le T6SS sur la transmission du microbiote des graines. En effet, en l'absence de SynCom, l'inoculation de la souche étudiée en grande quantité n'aurait pas permis la détection des microorganismes natifs déjà difficilement détectables au niveau des graines à cause de leurs très faibles abondances.

Bien que l'utilisation de SynComs émerge comme une approche prometteuse pour étudier les mécanismes impliqués dans la transmission des microorganismes des graines aux plantules (Abdelfattah et al., 2022), seulement deux études (de notre laboratoire) ont déployé cette approche (Arnault et al., 2024; Simonin et al., 2023) et une seule en confrontation avec du sol (Arnault et al., 2024). Dans cette dernière étude, les membres des SynComs représentent en moyenne 85% du microbiote des plantules de haricot. A titre de comparaison, en absence de SynComs, les communautés indigènes des graines de haricot contribuent à environ 5% du microbiote des plantules (Arnault et al., 2024; Chesneau et al., 2022). Chez cette espèce végétale, l'inoculation de SynCom a donc un très fort impact sur les interactions microbiennes qui prennent place lors de la transition graine-plantule. La situation est très différente dans notre modèle d'étude puisque les membres des SynComs contribuent à hauteur de 20% de la composition du microbiote des plantules (**chapitre 2**). Ce taux de transmission observé est

cohérent avec ceux observés lors de la transmission du microbiote indigène des graines chez plusieurs espèces végétales (Johnston-Monje et al., 2021). Dans nos conditions expérimentales, la source majeure d'inoculum était le sol comme précédemment observé au sein de deux autres espèces végétales : le colza (Rocheffort et al., 2021) et le blé (Walsh et al., 2021).

2. L'impact du T6SS de *S. rhizophila* CFBP13503 sur la dynamique de transmission des communautés bactériennes de la graine à la plantule.

Le T6SS de *S. rhizophila* CFBP13503 a un impact significatif sur l'assemblage des communautés bactériennes lors de la transition graine-plantule. L'influence du T6SS sur la structuration des communautés est notamment due à des impacts précoces sur certains taxons bactériens spécifiques provenant de la graine ou du sol, induisant ainsi des changements dans les interactions entre les microorganismes. Par conséquent, le T6SS favorise directement ou indirectement le développement d'autres taxons bactériens, ce qui entraîne des dynamiques d'assemblage distinctes.

Au vu du fort impact structurant du T6SS de *S. rhizophila* CFBP13503 sur les SynCom *in vitro*, un effet plus prononcé sur la structuration des communautés lors de la transition graine-plantule était attendu. Or, l'impact du T6SS de *S. rhizophila* semble limité dans les environnements complexes. Des observations similaires existent au niveau de la galle du collet de la tomate, une maladie causée par l'agent phytopathogène *A. tumefaciens* C58 (Wang et al., 2023). Dans cet habitat, seuls deux taxons bactériens sont impactés par le T6SS d'*A. tumefaciens* C58. Le T6SS de C58 n'est donc pas le moteur principal de l'assemblage du gallobiome mais induit, dans une moindre mesure, des dynamiques d'assemblage distinctes.

3. L'avantage compétitif conféré par le T6SS lors de la transition graine-plantule

Le T6SS confère un avantage compétitif à *S. rhizophila* CFBP13503 seulement lorsqu'elle est inoculée sur graine avec une communauté bactérienne synthétique composée de membres bactériens sensibles à son T6SS. Le T6SS confère donc un avantage compétitif à *S. rhizophila* CFBP13503 mais cet avantage varie en fonction du microbiote environnant.

L'avantage procuré par le T6SS est détectable dès la colonisation des graines, mettant en évidence l'influence du T6SS sur la colonisation de nouveaux espaces. Cet avantage perdure

ensuite au niveau des graines germées où plusieurs taxons sont négativement impactés par la présence du T6SS de *S. rhizophila* CFBP13503, puis au niveau des plantules. Ces résultats, présentés dans le chapitre 2, nous indiquent donc que si une bactérie qui colonise un nouvel espace est confrontée à des compétiteurs sensibles, son T6SS peut lui conférer un avantage compétitif qui perdure ensuite dans le temps.

A ce stade, il est difficile de dire si les différences de population entre la souche sauvage et le mutant Δ T6SS au niveau des plantules est dû à la seule activité antimicrobienne du T6SS de *S. rhizophila* CFBP13503. En effet, nous savons que la bactérie utilise son T6SS au niveau des graines germées puisque nous avons observé une diminution de l'abondance relative des bactéries de la SynCom sensible lorsqu'elle a son T6SS fonctionnel. Toutefois, nous ne savons pas si *S. rhizophila* CFBP13503 exprime bien son T6SS au niveau des plantules. Nous avons détecté des différentiels d'abondance relative pour certains taxons telluriques entre les deux conditions mais ces différences d'abondance pourraient résulter des impacts précoces que *S. rhizophila* CFBP13503 peut avoir niveau des graines germées. De plus, les différences de taille de population entre la souche sauvage et le mutant Δ T6SS observées au niveau des plantules pourraient être dues à un effet de masse plutôt qu'à une activité antimicrobienne persistante. En effet, la taille de population plus importante de la souche sauvage au niveau des graines germées pourrait expliquer sa taille plus importante au niveau des plantules. Il serait intéressant de faire varier la quantité de *S. rhizophila* CFBP13503 inoculée afin d'évaluer s'il s'agit d'un effet de masse qui est observé. Cependant, des études de transcriptomique seraient nécessaires pour évaluer si le T6SS de *S. rhizophila* CFBP13503 est bien exprimé au niveau des différents compartiments de la plante.

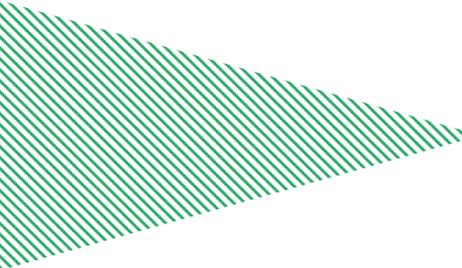
Finalement, en absence de communautés synthétiques ou lorsque *S. rhizophila* CFBP13503 est co-inoculée avec une SynCom composée majoritairement de bactéries résistantes à son T6SS, son T6SS ne lui procure pas d'avantage compétitif. Une étude portant sur la distribution des T6SS au sein des écosystèmes marins a révélé que l'abondance des bactéries porteuses de T6SS augmente lorsque les nutriments sont moins disponibles (Kempnich and Sison-Mangus, 2020). Les auteurs ont observé que l'abondance relative de certaines bactéries porteuses de T6SS était positivement corrélée aux concentrations en nutriments. Cependant, pour beaucoup d'entre elles, leur abondance était négativement corrélée à la biomasse phytoplanctonique qui est une grande source de nutriment pour ces bactéries. Ces résultats suggèrent que d'autres bactéries

hétérotrophes (non porteuses de T6SS) surpassent potentiellement les bactéries porteuses de T6SS lorsque les réserves en carbone organique et autres facteurs de croissance sont élevées. En revanche, lorsque la biomasse en phytoplancton baisse et donc que les ressources sont limitées, les bactéries porteuses de T6SS prospèrent car leurs T6SS leur procureraient un avantage compétitif (Kempnich and Sison-Mangus, 2020). Lors de la germination des graines, de nombreux exsudats sont libérés dans l'environnement proche (Nelson, 2004). Par conséquent, les microorganismes vont entrer en compétition et se diviser plus ou moins rapidement en fonction de leur efficacité à utiliser ces ressources. Dans ces situations, la compétition d'interférence par contact, est peut-être moins adaptée que la production de molécules diffusibles. Ainsi, il se pourrait que le T6SS soit un mécanisme plutôt adapté à des espaces restreints en taille (favorisant le contact cellulaire) où les ressources en nutriment sont limitées. Les graines répondant à ces critères, nous pouvons donc émettre l'hypothèse que les compétitions inter-microbiennes médiées par le T6SS auraient davantage un impact lors de l'assemblage du microbiote des graines plutôt que lors de la transmission du microbiote des graines aux plantules.

Plusieurs perspectives peuvent alors être tirées de ces observations :

- **Etudier le lien entre compétition d'exploitation et interférence par le T6SS.** Pour étudier cela, nous pourrions construire des communautés synthétiques composées de bactéries ayant un recouvrement métabolique plus ou moins important. En faisant varier la nature et les concentrations des sources de carbones et autres nutriments, nous pourrions évaluer si le T6SS est d'avantage impliqué lorsque le recouvrement métabolique entre les souches est fort et que les ressources nutritives sont faibles.
- **Etudier si l'impact du T6SS dépend de la nature et de la concentration des exsudats relargués lors de la germination.** Des milieux synthétiques mimant la composition des exsudats des graines pourraient être utilisés pour analyser la contribution de classes de métabolites à l'expression du T6SS. Une approche complémentaire serait d'évaluer l'impact du T6SS sur la transmission du microbiote des graines à la plantule en faisant varier les espèces végétales utilisées (Vančura and Hanzlíková, 1972).

- **Etudier l'impact du T6SS sur la dynamique d'assemblage du microbiote des graines.** Pour ce faire, nous pourrions inoculer la souche sauvage ou les mutants Δ T6SS de *S. rhizophila* CFBP13503 par pulvérisation florale (Mitter et al., 2017). L'impact de cette inoculation florale sur la composition du microbiote des graines matures pourrait ensuite être évalué à l'instar des études réalisées sur les agents phytopathogènes *X. campestris* pv. *campestris* et *Alternaria brassicicola* (Rezki et al., 2016).



REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Abby, S.S., Cury, J., Guglielmini, J., Néron, B., Touchon, M. & Rocha, E.P.C. (2016) Identification of protein secretion systems in bacterial genomes. *Scientific Reports*, 6, 23080. <https://doi.org/10.1038/srep23080>.
- Abdelfattah, A., Tack, A.J.M., Lobato, C., Wassermann, B. & Berg, G. (2022) From seed to seed: the role of microbial inheritance in the assembly of the plant microbiome. *Trends in Microbiology*, 31(4), 346–355. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2022.10.009>.
- Abdelfattah, A., Wisniewski, M., Schena, L. & Tack, A.J.M. (2021) Experimental evidence of microbial inheritance in plants and transmission routes from seed to phyllosphere and root. *Environmental Microbiology*, 23, 2199–2214. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.15392>.
- Alavi, P., Starcher, M., Zachow, C., Mueller, H. & Berg, G. (2013) Root-microbe systems: the effect and mode of interaction of Stress Protecting Agent (SPA) *Stenotrophomonas rhizophila* DSM14405T. *Frontiers in Plant Science*, 4, 141. <https://doi.org/10/f3sm26>.
- Alavi, P., Starcher, M.R., Thallinger, G.G., Zachow, C., Müller, H. & Berg, G. (2014) *Stenotrophomonas* comparative genomics reveals genes and functions that differentiate beneficial and pathogenic bacteria. *BMC Genomics*, 15, 482. <https://doi.org/10/gb3g3z>.
- Allsopp, L.P. & Bernal, P. (2023) Killing in the name of: T6SS structure and effector diversity. *Microbiology*, 169, 001367. <https://doi.org/10.1099/mic.0.001367>.
- Alves, J.A., Leal, F.C., Previato-Mello, M. & Silva Neto, J.F. da (2022) A Quorum Sensing-regulated Type VI Secretion System containing multiple nonredundant VgrG proteins is required for interbacterial competition in *Chromobacterium violaceum*. *Microbiology Spectrum*, 10, e01576-22. <https://doi.org/10.1128/spectrum.01576-22>.
- Arnault, G., Marais, C., Préveaux, A., Briand, M., Poisson, A. S., Sarniguet, A., Barret, M., & Simonin, M. (2024). Seedling microbiota engineering using bacterial synthetic community inoculation on seeds. *FEMS microbiology ecology*, 100(4), fiae027. <https://doi.org/10.1093/femsec/fiae027>
- Aschtgen, M.-S., Thomas, M.S. & Cascales, E. (2010) Anchoring the type VI secretion system to the peptidoglycan: TssL, TagL, TagP... what else? *Virulence*, 1, 535–540. <https://doi.org/10.4161/viru.1.6.13732>.
- Asolkar, T. & Ramesh, R. (2020) The involvement of the Type Six Secretion System (T6SS) in the virulence of *Ralstonia solanacearum* on brinjal. *3 Biotech*, 10, 324. <https://doi.org/10.1007/s13205-020-02311-4>.
- Aubert, D.F., Xu, H., Yang, J., Shi, X., Gao, W., Li, L., et al. (2016) A *Burkholderia* Type VI effector deamidates Rho GTPases to activate the pyrin inflammasome and trigger inflammation. *Cell Host & Microbe*, 19, 664–674. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2016.04.004>.
- Bairey, E., Kelsic, E.D. & Kishony, R. (2016) High-order species interactions shape ecosystem diversity. *Nature Communications*, 7, 12285. <https://doi.org/10.1038/ncomms12285>.

-
- Bansal, K., Kumar, S., Kaur, A., Singh, A. & Patil, P.B. (2021) Deep phylo-taxono genomics reveals *Xylella* as a variant lineage of plant associated *Xanthomonas* and supports their taxonomic reunification along with *Stenotrophomonas* and *Pseudoxanthomonas*. *Genomics*, 113, 3989–4003. <https://doi.org/10.1016/j.ygeno.2021.09.021>.
- Barret, M., Briand, M., Bonneau, S., Prévieux, A., Valière, S., Bouchez, O., et al. (2015) Emergence shapes the structure of the seed microbiota Drake, H.L. (Ed.). *Applied and Environmental Microbiology*, 81, 1257–1266. <https://doi.org/10/f6zrxf>.
- Barret, M., Egan, F., Fargier, E., Morrissey, J.P. & O’Gara, F. (2011) Genomic analysis of the type VI secretion systems in *Pseudomonas* spp.: novel clusters and putative effectors uncovered. *Microbiology (Reading, England)*, 157, 1726–1739. <https://doi.org/10/ctzxb8>.
- Barret, M., Egan, F. & O’Gara, F. (2013) Distribution and diversity of bacterial secretion systems across metagenomic datasets. *Environmental Microbiology Reports*, 5, 117–126. <https://doi.org/10/f4nn9v>.
- Barret, M., Guimbaud, J., Darrasse, A. & Jacques, M. (2016) Plant microbiota affects seed transmission of phytopathogenic microorganisms. *Molecular Plant Pathology*, 17, 791–795. <https://doi.org/10/gpcjbv>.
- Barretto, L.A.F. & Fowler, C.C. (2020) Identification of a putative T6SS immunity islet in *Salmonella Typhi*. *Pathogens*, 9, 559. <https://doi.org/10.3390/pathogens9070559>.
- Basler, M. (2015) Type VI secretion system: secretion by a contractile nanomachine. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences*, 370(1679), 20150021. <https://doi.org/10/gpcjbq>.
- Basler, M., Ho, B.T. & Mekalanos, J.J. (2013) Tit-for-Tat: type VI secretion system counterattack during bacterial cell-cell interactions. *Cell*, 152, 884–894. <https://doi.org/10/f4nxs2>.
- Basler, M. & Mekalanos, J.J. (2012) Type 6 secretion dynamics within and between bacterial cells. *Science*, 337, 815–815. <https://doi.org/10.1126/science.1222901>.
- Basler, M., Pilhofer, M., Henderson, G.P., Jensen, G.J. & Mekalanos, J.J. (2012) Type VI secretion requires a dynamic contractile phage tail-like structure. *Nature*, 483, 182–186. <https://doi.org/10.1038/nature10846>.
- Bayer-Santos, E., Ceseti, L. de M., Farah, C.S. & Alvarez-Martinez, C.E. (2019) Distribution, function and regulation of type 6 secretion systems of *Xanthomonadales*. *Frontiers in Microbiology*, 10. <https://doi.org/10/gpcjck>.
- Bayer-Santos, E., Lima, L. dos P., Ceseti, L. de M., Ratagami, C.Y., Santana, E.S. de, Silva, A.M. da, et al. (2018) *Xanthomonas citri* T6SS mediates resistance to *Dictyostelium* predation and is regulated by an ECF σ factor and cognate Ser/Thr kinase. *Environmental Microbiology*, 20, 1562–1575. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.14085>.
-

- Berg, G., Egamberdieva, D., Lugtenberg, B. & Hagemann, M. (2010) Symbiotic plant–microbe interactions: stress protection, plant growth promotion, and biocontrol by *Stenotrophomonas*. In: Seckbach, J. and Grube, M. (Eds.) *Symbioses and Stress: Joint Ventures in Biology Cellular Origin, Life in Extreme Habitats and Astrobiology*, vol 17. Springer, Dordrecht. https://doi.org/10.1007/978-90-481-9449-0_22
- Bernal, P., Allsopp, L.P., Filloux, A. & Llamas, M.A. (2017) The *Pseudomonas putida* T6SS is a plant warden against phytopathogens. *The ISME Journal*, 11, 972–987. <https://doi.org/10/f9j9z8>.
- Bernal, P., Furniss, R.C.D., Fecht, S., Leung, R.C.Y., Spiga, L., Mavridou, D.A.I., et al. (2021) A novel stabilization mechanism for the type VI secretion system sheath. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 118, e2008500118. <https://doi.org/10.1073/pnas.2008500118>.
- Bernal, P., Llamas, M.A. & Filloux, A. (2018) Type VI secretion systems in plant-associated bacteria. *Environmental Microbiology*, 20, 1–15. <https://doi.org/10/gpcjb8>.
- Bernal, P., Murillo-Torres, M. & Allsopp, L.P. (2020) Integrating signals to drive type VI secretion system killing. *Environmental Microbiology*, 22, 4520–4523. <https://doi.org/10/gpcjdf>.
- Berni, B., Soscia, C., Djermoun, S., Ize, B. & Bleves, S. (2019) A type VI secretion system trans-kingdom effector is required for the delivery of a novel antibacterial toxin in *Pseudomonas aeruginosa*. *Frontiers in Microbiology*, 10, 1218. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.01218>.
- Bladergroen, M.R., Badelt, K. & Spaik, H.P. (2003) Infection-blocking genes of a symbiotic *Rhizobium leguminosarum* strain that are involved in temperature-dependent protein secretion. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 16, 53–64. <https://doi.org/10.1094/MPMI.2003.16.1.53>.
- Böck, D., Medeiros, J.M., Tsao, H.-F., Penz, T., Weiss, G.L., Aistleitner, K., et al. (2017) In situ architecture, function, and evolution of a contractile injection system. *Science*, 357, 713–717. <https://doi.org/10.1126/science.aan7904>.
- Bongiovanni, T.R., Latario, C.J., Le Cras, Y., Trus, E., Robitaille, S., Swartz, K., et al. (2024) Assembly of a unique membrane complex in type VI secretion systems of Bacteroidota. *Nature Communications*, 15, 429. <https://doi.org/10.1038/s41467-023-44426-1>.
- Borgeaud, S., Metzger, L.C., Scignari, T. & Blokesch, M. (2015) The type VI secretion system of *Vibrio cholerae* fosters horizontal gene transfer. *Science*, 347, 63–67. <https://doi.org/10.1126/science.1260064>.
- Bourigault, Y., Dupont, C.A., Desjardins, J.B., Doan, T., Bouteiller, M., Le Guenno, H., et al. (2023) *Pseudomonas fluorescens* MFE01 delivers a putative type VI secretion amidase that confers biocontrol against the soft-rot pathogen *Pectobacterium atrosepticum*. *Environmental Microbiology*, 25, 2564–2579. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.16492>.
- Bouteiller, M., Gallique, M., Bourigault, Y., Kosta, A., Hardouin, J., Massier, S., et al. (2020) Crosstalk between the type VI secretion system and the expression of class IV flagellar genes in the *Pseudomonas fluorescens* MFE01 strain. *Microorganisms*, 8, 622. <https://doi.org/10/gpcjdg>.

- Boyer, F., Fichant, G., Berthod, J., Vandenbrouck, Y. & Attree, I. (2009) Dissecting the bacterial type VI secretion system by a genome wide in silico analysis: what can be learned from available microbial genomic resources? *BMC genomics*, 10, 104. <https://doi.org/10/d9zrmt>.
- Brackmann, M., Wang, J. & Basler, M. (2018) Type VI secretion system sheath inter-subunit interactions modulate its contraction. *EMBO reports*, 19, 225–233. <https://doi.org/10.15252/embr.201744416>.
- Bröms, J., Sjöstedt, A. & Lavander, M. (2010) The role of the *Francisella Tularensis* pathogenicity island in type VI secretion, intracellular survival, and modulation of host cell signaling. *Frontiers in microbiology*, 1, 136. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2010.00136>.
- Brooke, J.S. (2021) Advances in the microbiology of *Stenotrophomonas maltophilia*. *Clinical Microbiology Reviews*, 34, 10.1128/cmr.00030-19. <https://doi.org/10.1128/cmr.00030-19>.
- Brooke, J.S., Di Bonaventura, G., Berg, G. & Martinez, J.-L. (2017) Editorial: a multidisciplinary look at *Stenotrophomonas maltophilia*: an emerging multi-drug-resistant global opportunistic pathogen. *Frontiers in microbiology*, 8, 1511. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.01511>.
- Bruin, O.M. de, Ludu, J.S. & Nano, F.E. (2007) The *Francisella* pathogenicity island protein IgIA localizes to the bacterial cytoplasm and is needed for intracellular growth. *BMC Microbiology*, 7, 1. <https://doi.org/10.1186/1471-2180-7-1>.
- Brunet, Y.R., Espinosa, L., Harchouni, S., Mignot, T. & Cascales, E. (2013) Imaging type VI secretion-mediated bacterial killing. *Cell Reports*, 3, 36–41. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2012.11.027>.
- Brunet, Y.R., Hénin, J., Celia, H. & Cascales, E. (2014) Type VI secretion and bacteriophage tail tubes share a common assembly pathway. *EMBO reports*, 15, 315–321. <https://doi.org/10.1002/embr.201337936>.
- Brunet, Y.R., Zoued, A., Boyer, F., Douzi, B. & Cascales, E. (2015) The type VI secretion TssEFGK-VgrG phage-like baseplate is recruited to the tssJLM membrane complex via multiple contacts and serves as assembly platform for tail tube/sheath polymerization. *PLoS genetics*, 11, e1005545. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1005545>.
- Bulgarelli, D., Schlaeppli, K., Spaepen, S., Themaat, E.V.L. van & Schulze-Lefert, P. (2013) Structure and functions of the bacterial microbiota of plants. *Annual Review of Plant Biology*, 64, 807–838. <https://doi.org/10.1146/annurev-arplant-050312-120106>.
- Cao, Z., Casabona, M.G., Kneuper, H., Chalmers, J.D. & Palmer, T. (2016) The type VII secretion system of *Staphylococcus aureus* secretes a nuclease toxin that targets competitor bacteria. *Nature Microbiology*, 2, 1–11. <https://doi.org/10.1038/nmicrobiol.2016.183>.
- Casabona, M.G., Silverman, J.M., Sall, K.M., Boyer, F., Couté, Y., Poirel, J., et al. (2013) An ABC transporter and an outer membrane lipoprotein participate in posttranslational activation of type VI secretion in *Pseudomonas aeruginosa*. *Environmental Microbiology*, 15, 471–486. <https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2012.02816.x>.

- Cascales, E., Buchanan, S.K., Duché, D., Kleanthous, C., Llobès, R., Postle, K., et al. (2007) Colicin Biology. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 71, 158–229. <https://doi.org/10.1128/mnbr.00036-06>.
- Cascales, E. & Christie, P.J. (2003) The versatile bacterial Type IV Secretion System. *Nature reviews. Microbiology*, 1(2), 137–149. <https://doi.org/10.1038/nrmicro753>.
- Celik Ozgen, V., Kong, W., Blanchard, A.E., Liu, F. & Lu, T. (2018) Spatial interference scale as a determinant of microbial range expansion. *Science Advances*, 4, eaau0695. <https://doi.org/10.1126/sciadv.aau0695>.
- Ceresini, P.C., Castroagudín, V.L., Rodrigues, F.Á., Rios, J.A., Aucique-Pérez, C.E., Moreira, S.I., et al. (2019) Wheat blast: from its origins in South America to its emergence as a global threat. *Molecular Plant Pathology*, 20, 155–172. <https://doi.org/10.1111/mpp.12747>.
- Ceseti, L.M., Santana, E.S. de, Ratagami, C.Y., Barreiros, Y., Lima, L.D.P., Dunger, G., et al. (2019) The *Xanthomonas citri* pv. *citri* type VI secretion system is induced during epiphytic colonization of citrus. *Current Microbiology*, 76, 1105–1111. <https://doi.org/10.1007/s00284-019-01735-3>.
- Chakraborty, S., Li, M., Chatterjee, C., Sivaraman, J., Leung, K.Y. & Mok, Y.-K. (2010) Temperature and Mg²⁺ sensing by a novel PhoP-PhoQ two-component system for regulation of virulence in *Edwardsiella tarda*. *Journal of Biological Chemistry*, 285, 38876–38888. <https://doi.org/10.1074/jbc.M110.179150>.
- Chang, Y.-W., Rettberg, L.A., Ortega, D.R. & Jensen, G.J. (2017) *In vivo* structures of an intact type VI secretion system revealed by electron cryotomography. *EMBO reports*, 18, 1090–1099. <https://doi.org/10.15252/embr.201744072>.
- Chauviat, A., Meyer, T. & Favre-Bonté, S. (2023) Versatility of *Stenotrophomonas maltophilia*: Ecological roles of RND efflux pumps. *Heliyon*, 9, e14639. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2023.e14639>.
- Chen, N.W.G., Ruh, M., Darrasse, A., Foucher, J., Briand, M., Costa, J., et al. (2021) Common bacterial blight of bean: a model of seed transmission and pathological convergence. *Molecular Plant Pathology*, 22, 1464–1480. <https://doi.org/10.1111/mpp.13067>.
- Chen, W.-J., Kuo, T.-Y., Hsieh, F.-C., Chen, P.-Y., Wang, C.-S., Shih, Y.-L., et al. (2016) Involvement of type VI secretion system in secretion of iron chelator pyoverdine in *Pseudomonas taiwanensis*. *Scientific Reports*, 6, 1–14. <https://doi.org/10/f82pmg>.
- Cherrak, Y., Rapisarda, C., Pellarin, R., Bouvier, G., Bardiaux, B., Allain, F., et al. (2018) Biogenesis and structure of a type VI secretion baseplate. *Nature Microbiology*, 3, 1404–1416. <https://doi.org/10.1038/s41564-018-0260-1>.
- Chesneau, G., Laroche, B., Prévieux, A., Marais, C., Briand, M., Marolleau, B., et al. (2022) Single seed microbiota: assembly and transmission from parent plant to seedling. *mBio*, 13, e01648-22. <https://doi.org/10.1128/mbio.01648-22>.

- Chesneau, G., Torres-Cortes, G., Briand, M., Darrasse, A., Preveaux, A., Marais, C., et al. (2020) Temporal dynamics of bacterial communities during seed development and maturation. *FEMS Microbiology Ecology*, 96, fiae190. <https://doi.org/10.1093/femsec/fiae190>.
- Chialva, M., Lanfranco, L. & Bonfante, P. (2022) The plant microbiota: composition, functions, and engineering. *Current Opinion in Biotechnology*, 73, 135–142. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2021.07.003>.
- Cho, T.H.S., Pick, K. & Raivio, T.L. (2023) Bacterial envelope stress responses: Essential adaptors and attractive targets. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*, 1870, 119387. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2022.119387>.
- Chourashi, R., Das, S., Dhar, D., Okamoto, K., Mukhopadhyay, A.K. & Chatterjee, N.S. (2018) Chitin-induced T6SS in *Vibrio cholerae* is dependent on ChiS activation. *Microbiology*, 164, 751–763. <https://doi.org/10.1099/mic.0.000656>.
- Clemens, D.L., Ge, P., Lee, B.-Y., Horwitz, M.A. & Zhou, Z.H. (2015) Atomic structure of T6SS reveals interlaced array essential to function. *Cell*, 160, 940–951. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2015.02.005>.
- Compant, S., Mitter, B., Colli-Mull, J.G., Gangl, H. & Sessitsch, A. (2011) Endophytes of grapevine flowers, berries, and seeds: identification of cultivable bacteria, comparison with other plant parts, and visualization of niches of colonization. *Microbial Ecology*, 62, 188–197. <https://doi.org/10.1007/s00248-011-9883-y>.
- Cordero, O.X., Wildschutte, H., Kirkup, B., Proehl, S., Ngo, L., Hussain, F., et al. (2012) Ecological populations of bacteria act as socially cohesive units of antibiotic production and resistance. *Science*, 337, 1228–1231. <https://doi.org/10.1126/science.1219385>.
- Corso, M., Perreau, F., Rajjou, L., Ben Malek, R., Lepiniec, L. & Mouille, G. (2021) Chapter Two - specialized metabolites in seeds. In: Pétriacq, P. and Bouchereau, A. (Eds.) *Advances in botanical research plant metabolomics in full swing*. Academic Press, pp. 35–70.
- Costa, T.R.D., Patkowski, J.B., Macé, K., Christie, P.J. & Waksman, G. (2024) Structural and functional diversity of type IV secretion systems. *Nature Reviews Microbiology*, 22, 170–185. <https://doi.org/10.1038/s41579-023-00974-3>.
- Coyne, M.J., Roelofs, K.G. & Comstock, L.E. (2016) Type VI secretion systems of human gut Bacteroidales segregate into three genetic architectures, two of which are contained on mobile genetic elements. *BMC Genomics*, 17, 58. <https://doi.org/10.1186/s12864-016-2377-z>.
- Coyne, M.J., Zitomersky, N.L., McGuire, A.M., Earl, A.M. & Comstock, L.E. (2014) Evidence of extensive DNA transfer between bacteroidales species within the human gut. *mBio*, 5, e01305-01314. <https://doi.org/10.1128/mBio.01305-14>.
- Coyte, K.Z., Schluter, J. & Foster, K.R. (2015) The ecology of the microbiome: Networks, competition, and stability. *Science*, 350, 663–666. <https://doi.org/10.1126/science.aad2602>.

- Crisan, C.V., Van Tyne, D. & Goldberg, J.B. (2023) The type VI secretion system of the emerging pathogen *Stenotrophomonas maltophilia* complex has antibacterial properties. *mSphere*, 8, e00584-23. <https://doi.org/10.1128/msphere.00584-23>.
- Cummins, E.A., Moran, R.A., Snaith, A.E., Hall, R.J., Connor, C.H., Dunn, S.J., et al. (2023) Parallel loss of type VI secretion systems in two multi-drug-resistant *Escherichia coli* lineages. *Microbial Genomics*, 9, 001133. <https://doi.org/10.1099/mgen.0.001133>.
- Cutiño-Jiménez, A.M., Menck, C.F.M., Cambas, Y.T. & Díaz-Pérez, J.C. (2020) Protein signatures to identify the different genera within the *Xanthomonadaceae* family. *Brazilian Journal of Microbiology*, 51, 1515–1526. <https://doi.org/10.1007/s42770-020-00304-2>.
- Dal Co, A., Vliet, S. van, Kiviet, D.J., Schlegel, S. & Ackermann, M. (2020) Short-range interactions govern the dynamics and functions of microbial communities. *Nature Ecology & Evolution*, 4, 366–375. <https://doi.org/10.1038/s41559-019-1080-2>.
- Darrasse, A., Bureau, C., Samson, R., Morris, C.E. & Jacques, M.-A. (2007) Contamination of bean seeds by *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* associated with low bacterial densities in the phyllosphere under field and greenhouse conditions. *European Journal of Plant Pathology*, 119, 203–215. <https://doi.org/10.1007/s10658-007-9164-2>.
- Darrasse, A., Darsonval, A., Boureau, T., Brisset, M.-N., Durand, K. & Jacques, M.-A. (2010) Transmission of plant-pathogenic bacteria by nonhost seeds without induction of an associated defense reaction at emergence. *Applied and Environmental Microbiology*, 76, 6787–6796. <https://doi.org/10/dkrcm2>.
- De Sousa, B.F.S., Domingo-Serrano, L., Salinero-Lanzarote, A., Palacios, J.M. & Rey, L. (2023) The T6SS-dependent effector Re78 of *Rhizobium etli* mim1 benefits bacterial competition. *Biology*, 12, 678. <https://doi.org/10.3390/biology12050678>.
- Decoin, V., Gallique, M., Barbey, C., Le Mauff, F., Poc, C.D., Feuilloley, M.G., et al. (2015) A *Pseudomonas fluorescens* type 6 secretion system is related to mucoidy, motility and bacterial competition. *BMC Microbiology*, 15, 72. <https://doi.org/10.1186/s12866-015-0405-9>.
- Denancé, N. & Grimault, V. (2022) Seed pathway for pest dissemination: The ISTA Reference Pest List, a bibliographic resource in non-vegetable crops. *EPPO Bulletin*, 52, 434–445. <https://doi.org/10.1111/epp.12834>.
- Deng, W., Marshall, N.C., Rowland, J.L., McCoy, J.M., Worrall, L.J., Santos, A.S., et al. (2017) Assembly, structure, function and regulation of type III secretion systems. *Nature Reviews Microbiology*, 15, 323–337. <https://doi.org/10.1038/nrmicro.2017.20>.
- Di Venanzio, G., Moon, K.H., Weber, B.S., Lopez, J., Ly, P.M., Potter, R.F., et al. (2019) Multidrug-resistant plasmids repress chromosomally encoded T6SS to enable their dissemination. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 116, 1378–1383. <https://doi.org/10/gpcjc8>.

- Dong, T.G., Ho, B.T., Yoder-Himes, D.R. & Mekalanos, J.J. (2013) Identification of T6SS-dependent effector and immunity proteins by Tn-seq in *Vibrio cholerae*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 110, 2623–2628. <https://doi.org/10.1073/pnas.1222783110>.
- D'Souza, G., Shitut, S., Preussger, D., Yousif, G., Waschina, S. & Kost, C. (2018) Ecology and evolution of metabolic cross-feeding interactions in bacteria. *Natural Product Reports*, 35, 455–488. <https://doi.org/10.1039/C8NP00009C>.
- Egamberdieva, D., Jabborova, D. & Berg, G. (2016) Synergistic interactions between *Bradyrhizobium japonicum* and the endophyte *Stenotrophomonas rhizophila* and their effects on growth, and nodulation of soybean under salt stress. *Plant and Soil*, 405, 35–45. <https://doi.org/10.1007/s11104-015-2661-8>.
- Egamberdieva, D., Kucharova, Z., Davranov, K., Berg, G., Makarova, N., Azarova, T., et al. (2011) Bacteria able to control foot and root rot and to promote growth of cucumber in salinated soils. *Biology and Fertility of Soils*, 47, 197–205. <https://doi.org/10.1007/s00374-010-0523-3>.
- Eshraghi, A., Kim, J., Walls, A.C., Ledvina, H.E., Miller, C.N., Ramsey, K.M., et al. (2016) Secreted effectors encoded within and outside of the *Francisella* pathogenicity island promote intramacrophage growth. *Cell Host & Microbe*, 20, 573–583. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2016.10.008>.
- Filloux, A. (2024) Bacterial type VI secretion system (T6SS) helps prevent cheating in microbial communities. *The ISME Journal*, 18, wrae003. <https://doi.org/10.1093/ismejo/wrae003>.
- Filloux, A., Hachani, A. & Bleves, S. (2008) The bacterial type VI secretion machine: yet another player for protein transport across membranes. *Microbiology*, 154, 1570–1583. <https://doi.org/10.1099/mic.0.2008/016840-0>.
- Fitzpatrick, C.R., Copeland, J., Wang, P.W., Guttman, D.S., Kotanen, P.M. & Johnson, M.T.J. (2018) Assembly and ecological function of the root microbiome across angiosperm plant species. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 115, E1157–E1165. <https://doi.org/10.1073/pnas.1717617115>.
- Flaugnatti, N., Le, T.T.H., Canaan, S., Aschtgen, M.-S., Nguyen, V.S., Blangy, S., et al. (2016) A phospholipase A1 antibacterial type VI secretion effector interacts directly with the C-terminal domain of the VgrG spike protein for delivery. *Molecular Microbiology*, 99, 1099–1118. <https://doi.org/10.1111/mmi.13292>.
- 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. *Microbiology and Molecular Biology Reviews: MMBR*, 75, 583–609. <https://doi.org/10.1128/MMBR.00020-11>.

- Gao, J., Wu, Shimin, Liu, Y., Wu, Shanghua, Jiang, C., Li, X., et al. (2020) Characterization and transcriptomic analysis of a highly Cr(VI)-resistant and -reductive plant-growth-promoting rhizobacterium *Stenotrophomonas rhizophila* DSM14405T. *Environmental Pollution*, 263, 114622. <https://doi.org/10/gpcjdm>.
- García-Bayona, L., Coyne, M.J. & Comstock, L.E. (2021) Mobile Type VI secretion system loci of the gut Bacteroidales display extensive intra-ecosystem transfer, multi-species spread and geographical clustering. *PLoS Genetics*, 17, e1009541. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1009541>.
- Garin, T., Brin, C., Prévieux, A., Brault, A., Briand, M., Simonin, M., et al. (2024) The type VI secretion system of *Stenotrophomonas rhizophila* CFBP13503 limits the transmission of *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* 8004 from radish seeds to seedlings. *Molecular Plant Pathology*, 25, e13412. <https://doi.org/10.1111/mpp.13412>.
- Ghoul, M. & Mitri, S. (2016) The ecology and evolution of microbial competition. *Trends in Microbiology*, 24, 833–845. <https://doi.org/10/f86qb5>.
- Glick, B.R. (2012) Plant growth-promoting bacteria: mechanisms and applications. *Scientifica*, 2012, 963401. <https://doi.org/10.6064/2012/963401>.
- Glick, B.R., Cheng, Z., Czarny, J. & Duan, J. (2007) Promotion of plant growth by ACC deaminase-producing soil bacteria. *European Journal of Plant Pathology*, 119, 329–339. <https://doi.org/10.1007/s10658-007-9162-4>.
- Gode-Potratz, C.J. & McCarter, L.L. (2011) Quorum sensing and silencing in *Vibrio parahaemolyticus*. *Journal of Bacteriology*, 193, 4224–4237. <https://doi.org/10.1128/JB.00432-11>.
- Goldford, J.E., Lu, N., Bajić, D., Estrela, S., Tikhonov, M., Sanchez-Gorostiaga, A., et al. (2018) Emergent simplicity in microbial community assembly. *Science*, 361, 469–474. <https://doi.org/10.1126/science.aat1168>.
- Gordon, D.M., Oliver, E. & Littlefield-Wyer, J. (2007) The diversity of bacteriocins in gram-negative bacteria. In: Riley, M.A. and Chavan, M.A. (Eds.) *Bacteriocins: ecology and evolution*. Berlin, Heidelberg: Springer, pp. 5–18. https://doi.org/10.1007/978-3-540-36604-1_2.
- Gralka, M., Szabo, R., Stocker, R. & Cordero, O.X. (2020) Trophic interactions and the drivers of microbial community assembly. *Current Biology*, 30, R1176–R1188. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2020.08.007>.
- Granato, E.T., Meiller-Legrand, T.A. & Foster, K.R. (2019) The evolution and ecology of bacterial warfare. *Current Biology*, 29, R521–R537. <https://doi.org/10/ggjr4m>.
- Granato, E.T., Smith, W.P.J. & Foster, K.R. (2023) Collective protection against the type VI secretion system in bacteria. *The ISME Journal*, 17, 1052–1062. <https://doi.org/10.1038/s41396-023-01401-4>.

- Grilli, J., Barabás, G., Michalska-Smith, M.J. & Allesina, S. (2017) Higher-order interactions stabilize dynamics in competitive network models. *Nature*, 548, 210–213. <https://doi.org/10.1038/nature23273>.
- Guckes, K.R., Yount, T.A., Steingard, C.H. & Miyashiro, T.I. (2023) Quorum sensing inhibits interference competition among bacterial symbionts within a host. *Current biology: CB*, 33, 4244–4251.e4. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2023.08.051>.
- Gude, S., Pinçe, E., Taute, K.M., Seinen, A.-B., Shimizu, T.S. & Tans, S.J. (2020) Bacterial coexistence driven by motility and spatial competition. *Nature*, 578, 588–592. <https://doi.org/10.1038/s41586-020-2033-2>.
- Gupta, S., Ray, S., Khan, A., China, A., Das, D. & Mallick, A.I. (2021) The cost of bacterial predation via type VI secretion system leads to predator extinction under environmental stress. *iScience*, 24, 103507. <https://doi.org/10.1016/j.isci.2021.103507>.
- Habich, A., Galeev, A., Vargas, V.C., Vogler, O., Ghoul, M., Andersen, S.B., et al. (2022) Core and accessory effectors of type VI secretion systems contribute differently to the intraspecific diversity of *Pseudomonas aeruginosa*. *bioRxiv*, 2022.04.11.487527. <https://doi.org/10.1101/2022.04.11.487527>.
- Hagan, M., Pankov, G., Gallegos-Monterrosa, R., Williams, D.J., Earl, C., Buchanan, G., et al. (2023) Rhs NADase effectors and their immunity proteins are exchangeable mediators of inter-bacterial competition in *Serratia*. *Nature Communications*, 14, 6061. <https://doi.org/10.1038/s41467-023-41751-3>.
- Hagemann, M., Ribbeck-Busch, K., Klähn, S., Hasse, D., Steinbruch, R. & Berg, G. (2008) The plant-associated bacterium *Stenotrophomonas rhizophila* expresses a new enzyme for the synthesis of the compatible solute glucosylglycerol. *Journal of Bacteriology*, 190, 5898–5906. <https://doi.org/10/b3hc49>.
- Han, Y., Wang, T., Chen, G., Pu, Q., Liu, Q., Zhang, Y., et al. (2019) A *Pseudomonas aeruginosa* type VI secretion system regulated by CueR facilitates copper acquisition. *PLOS Pathogens*, 15, e1008198. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1008198>.
- Hardin, G. (1968) The tragedy of the commons. *Science*, 162, 1243–1248. <http://dx.doi.org/10.1126/science.162.3859.1243>.
- Hassani, M.A., Durán, P. & Hacquard, S. (2018) Microbial interactions within the plant holobiont. *Microbiome*, 6, 58. <https://doi.org/10/gdbjrn>.
- Ha-Tran, D.M., Nguyen, T.T.M., Hung, S.-H., Huang, E. & Huang, C.-C. (2021) Roles of plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR) in stimulating salinity stress defense in plants: a review. *International Journal of Molecular Sciences*, 22, 3154. <https://doi.org/10.3390/ijms22063154>.

- Hayes, C.S., Koskiniemi, S., Ruhe, Z.C., Poole, S.J. & Low, D.A. (2014) Mechanisms and biological roles of Contact-Dependent Growth Inhibition Systems. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, 4, a010025. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a010025>.
- Heiman, C.M., Vacheron, J. & Keel, C. (2023) Evolutionary and ecological role of extracellular contractile injection systems: from threat to weapon. *Frontiers in Microbiology*, 14, 1264877. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2023.1264877>.
- Hernandez Montiel, L.G., Zulueta Rodriguez, R., Angulo, C., Rueda Puente, E.O., Quiñonez Aguilar, E.E. & Galicia, R. (2017) Marine yeasts and bacteria as biological control agents against anthracnose on mango. *Journal of Phytopathology*, 165, 833–840. <https://doi.org/10.1111/jph.12623>.
- Hernandez, R.E., Gallegos-Monterrosa, R. & Coulthurst, S.J. (2020) Type VI secretion system effector proteins: effective weapons for bacterial competitiveness. *Cellular Microbiology*, 22, e13241. <https://doi.org/10/gpcjdg>.
- Herrera Paredes, S. & Lebeis, S.L. (2016) Giving back to the community: microbial mechanisms of plant–soil interactions. *Functional Ecology*, 30, 1043–1052. <https://doi.org/10.1111/1365-2435.12684>.
- Hersch, S.J., Manera, K. & Dong, T.G. (2020a) Defending against the type six secretion system: beyond immunity genes. *Cell Reports*, 33, 108259. <https://doi.org/10/gpcjdr>.
- Hersch, S.J., Watanabe, N., Stietz, M.S., Manera, K., Kamal, F., Burkinshaw, B., et al. (2020b) Envelope stress responses defend against type six secretion system attacks independently of immunity proteins. *Nature Microbiology*, 5, 706–714. <https://doi.org/10/gpcjds>.
- Hespanhol, J.T., Nóbrega-Silva, L. & Bayer-Santos, E. (2023) Regulation of type VI secretion systems at the transcriptional, posttranscriptional and posttranslational level. *Microbiology*, 169, 001376. <https://doi.org/10.1099/mic.0.001376>.
- Heymann, J.B., Bartho, J.D., Rybakova, D., Venugopal, H.P., Winkler, D.C., Sen, A., et al. (2013) Three-dimensional structure of the toxin-delivery particle antifeeding prophage of *Serratia entomophila*. *Journal of Biological Chemistry*, 288, 25276–25284. <https://doi.org/10.1074/jbc.M113.456145>.
- Hibbing, M.E., Fuqua, C., Parsek, M.R. & Peterson, S.B. (2010) Bacterial competition: surviving and thriving in the microbial jungle. *Nature reviews. Microbiology*, 8, 15–25. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2259>.
- Ho, B.T., Basler, M. & Mekalanos, J.J. (2013) Type 6 secretion system-mediated immunity to type 4 secretion system-mediated gene transfer. *Science (New York, N.Y.)*, 342, 250–253. <https://doi.org/10.1126/science.1243745>.
- Hug, L.A., Baker, B.J., Anantharaman, K., Brown, C.T., Probst, A.J., Castelle, C.J., et al. (2016) A new view of the tree of life. *Nature Microbiology*, 1, 1–6. <https://doi.org/10.1038/nmicrobiol.2016.48>.

- Hug, S., Heiniger, B., Bolli, K., Paszti, S., Eberl, L., Ahrens, C.H., et al. (2023) *Paraburkholderia sabiae* uses one type VI secretion system (T6SS-1) as a powerful weapon against notorious plant pathogens. *Microbiology Spectrum*, 11, e01622-23. <https://doi.org/10.1128/spectrum.01622-23>.
- Hurst, M.R.H., Glare, T.R. & Jackson, T.A. (2004) Cloning *Serratia entomophila* Antifeeding genes—a putative defective prophage active against the grass grub *costelytra zealandica*. *Journal of Bacteriology*, 186, 5116–5128. <https://doi.org/10.1128/jb.186.15.5116-5128.2004>.
- Ishikawa, T., Rompikuntal, P.K., Lindmark, B., Milton, D.L. & Wai, S.N. (2009) Quorum sensing regulation of the two hcp alleles in *Vibrio cholerae* O1 strains. *PLOS ONE*, 4, e6734. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0006734>.
- Ishikawa, T., Sabharwal, D., Bröms, J., Milton, D.L., Sjöstedt, A., Uhlin, B.E., et al. (2012) Pathoadaptive conditional regulation of the type VI secretion system in *Vibrio cholerae* O1 strains. *Infection and Immunity*, 80, 575–584. <https://doi.org/10.1128/IAI.05510-11>.
- Islam, M.T., Croll, D., Gladioux, P., Soanes, D.M., Persoons, A., Bhattacharjee, P., et al. (2016) Emergence of wheat blast in Bangladesh was caused by a South American lineage of *Magnaporthe oryzae*. *BMC biology*, 14, 84. <https://doi.org/10.1186/s12915-016-0309-7>.
- Jiang, F., Wang, X., Wang, B., Chen, L., Zhao, Z., Waterfield, N.R., et al. (2016) The *Pseudomonas aeruginosa* type VI secretion PGAP1-like effector induces host autophagy by activating endoplasmic reticulum stress. *Cell Reports*, 16, 1502–1509. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2016.07.012>.
- Jiang, F., Waterfield, N.R., Yang, J., Yang, G. & Jin, Q. (2014) A *Pseudomonas aeruginosa* type VI secretion phospholipase D effector targets both procaryotic and eukaryotic cells. *Cell Host & Microbe*, 15, 600–610. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2014.04.010>.
- Johnston-Monje, D., Gutiérrez, J.P. & Lopez-Lavalle, L.A.B. (2021) Seed-transmitted bacteria and fungi dominate juvenile plant microbiomes. *Frontiers in Microbiology*, 12, 737616. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.737616>.
- Jones, C.L., Clancy, M., Honnold, C., Singh, S., Snesrud, E., Onmus-Leone, F., et al. (2015) Fatal outbreak of an emerging clone of extensively drug-resistant *Acinetobacter baumannii* with enhanced virulence. *Clinical Infectious Diseases*, 61, 145–154. <https://doi.org/10.1093/cid/civ225>.
- Joshi, F., Archana, G. & Desai, A. (2006) siderophore cross-utilization amongst rhizospheric bacteria and the role of their differential affinities for Fe³⁺ on growth stimulation under iron-limited conditions. *Current Microbiology*, 53, 141–147. <https://doi.org/10.1007/s00284-005-0400-8>.
- Julkowska, M.M. & Testerink, C. (2015) Tuning plant signaling and growth to survive salt. *Trends in Plant Science*, 20, 586–594. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2015.06.008>.
- Jurénas, D. & Journet, L. (2021) Activity, delivery, and diversity of type VI secretion effectors. *Molecular Microbiology*, 115, 383–394. <https://doi.org/10.1111/mmi.14648>.

- Kai, M., Effmert, U., Berg, G. & Piechulla, B. (2007) Volatiles of bacterial antagonists inhibit mycelial growth of the plant pathogen *Rhizoctonia solani*. *Archives of Microbiology*, 187, 351–360. <https://doi.org/10/dqzfhj>.
- Kan, Y., Zhang, Y., Lin, W. & Dong, T. (2023) Differential plant cell responses to *Acidovorax citrulli* T3SS and T6SS reveal an effective strategy for controlling plant-associated pathogens. *mBio*, e0045923. <https://doi.org/10.1128/mbio.00459-23>.
- Kandolo, O., Cherrak, Y., Filella-Merce, I., Guenno, H.L., Kosta, A., Espinosa, L., et al. (2023) *Acinetobacter* type VI secretion system comprises a non-canonical membrane complex. *PLOS Pathogens*, 19, e1011687. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1011687>.
- Kapitein, N., Bönemann, G., Pietrosiuk, A., Seyffer, F., Hausser, I., Locker, J.K., et al. (2013) ClpV recycles VipA/VipB tubules and prevents non-productive tubule formation to ensure efficient type VI protein secretion. *Molecular Microbiology*, 87, 1013–1028. <https://doi.org/10.1111/mmi.12147>.
- Kempnich, M.W. & Sison-Mangus, M.P. (2020) Presence and abundance of bacteria with the type VI secretion system in a coastal environment and in the global oceans. *PLOS ONE*, 15, e0244217. <https://doi.org/10/gpcjdw>.
- Kim, H., Kim, C. & Lee, Y.-H. (2023) The single-seed microbiota reveals rare taxa-associated community robustness. *Phytobiomes Journal*, 7, 324–338. <https://doi.org/10.1094/PBIOMES-10-22-0068-R>.
- Kim, J., Lee, J.-Y., Lee, H., Choi, J.Y., Kim, D.H., Wi, Y.M., et al. (2017) Microbiological features and clinical impact of the type VI secretion system (T6SS) in *Acinetobacter baumannii* isolates causing bacteremia. *Virulence*, 8, 1378–1389. <https://doi.org/10.1080/21505594.2017.1323164>.
- Kim, N., Kim, J.J., Kim, I., Mannaa, M., Park, J., Kim, J., et al. (2020) Type VI secretion systems of plant-pathogenic *Burkholderia glumae* BGR1 play a functionally distinct role in interspecies interactions and virulence. *Molecular Plant Pathology*, 21, 1055–1069. <https://doi.org/10.1111/mpp.12966>.
- Kim, W., Racimo, F., Schluter, J., Levy, S.B. & Foster, K.R. (2014) Importance of positioning for microbial evolution. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 111, E1639–E1647. <https://doi.org/10.1073/pnas.1323632111>.
- Kirchberger, P.C., Unterweger, D., Provenzano, D., Pukatzki, S. & Boucher, Y. (2017) Sequential displacement of type VI Secretion System effector genes leads to evolution of diverse immunity gene arrays in *Vibrio cholerae*. *Scientific Reports*, 7, 45133. <https://doi.org/10/f9xzxs>.
- Klaedtke, S., Jacques, M.-A., Raggi, L., Prévieux, A., Bonneau, S., Negri, V., et al. (2016) Terroir is a key driver of seed-associated microbial assemblages. *Environmental Microbiology*, 18, 1792–1804. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.12977>.

- Kramer, J., Özkaya, Ö. & Kümmerli, R. (2020) Bacterial siderophores in community and host interactions. *Nature Reviews. Microbiology*, 18, 152–163. <https://doi.org/10.1038/s41579-019-0284-4>.
- Kube, S., Kapitein, N., Zimniak, T., Herzog, F., Mogk, A. & Wendler, P. (2014) Structure of the VipA/B type VI secretion complex suggests a contraction-state-specific recycling mechanism. *Cell Reports*, 8, 20–30. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2014.05.034>.
- Kube, S., Wendler, P., Kube, S. & Wendler, P. (2015) Structural comparison of contractile nanomachines. *AIMS Biophysics*, 2, 88–115. <https://doi.org/10.3934/biophy.2015.2.88>.
- Kudryashev, M., Wang, R.Y.-R., Brackmann, M., Scherer, S., Maier, T., Baker, D., et al. (2015) Structure of the Type VI secretion system contractile sheath. *Cell*, 160, 952–962. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2015.01.037>.
- Kumar, A., Soni, R., Kanwar, S.S. & Pabbi, S. (2019) *Stenotrophomonas*: a versatile diazotrophic bacteria from the rhizospheric soils of Western Himalayas and development of its liquid biofertilizer formulation. *Vegetos*, 32, 103–109. <https://doi.org/10.1007/s42535-019-00013-8>.
- Kumar, S., Bansal, K., Patil, P.P. & Patil, P.B. (2019) Phylogenomics insights into order and families of Lysobacterales. *Access Microbiology*, 1, e000015. <https://doi.org/10.1099/acmi.0.000015>.
- Kunz Coyne, A.J., Herbin, S., Caniff, K. & Rybak, M.J. (2023) Steno-sphere: Navigating the enigmatic world of emerging multidrug-resistant *Stenotrophomonas maltophilia*. *Pharmacotherapy: The Journal of Human Pharmacology and Drug Therapy*, 43, 833–846. <https://doi.org/10.1002/phar.2828>.
- LaCourse, K.D., Peterson, S.B., Kulasekara, H.D., Radey, M.C., Kim, J. & Mougous, J.D. (2018) Conditional toxicity and synergy drive diversity among antibacterial effectors. *Nature Microbiology*, 3, 440–446. <https://doi.org/10/gpcjcc>.
- Lara-Capistran, L., Zulueta-Rodriguez, R., Castellanos-Cervantes, T., Reyes-Perez, J.J., Preciado-Rangel, P. & Hernandez-Montiel, L.G. (2020) Efficiency of marine bacteria and yeasts on the biocontrol activity of *Pythium ultimum* in ancho-type pepper seedlings. *Agronomy*, 10, 408. <https://doi.org/10.3390/agronomy10030408>.
- Le, N.-H., Peters, K., Espaillet, A., Sheldon, J.R., Gray, J., Di Venanzio, G., et al. (2020) Peptidoglycan editing provides immunity to *Acinetobacter baumannii* during bacterial warfare. *Science Advances*, 6, eabb5614. <https://doi.org/10.1126/sciadv.abb5614>.
- Le, N.-H., Pinedo, V., Lopez, J., Cava, F. & Feldman, M.F. (2021) Killing of Gram-negative and Gram-positive bacteria by a bifunctional cell wall-targeting T6SS effector. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 118, e2106555118. <https://doi.org/10.1073/pnas.2106555118>.
- Leiman, P.G., Basler, M., Ramagopal, U.A., Bonanno, J.B., Sauder, J.M., Pukatzki, S., et al. (2009) Type VI secretion apparatus and phage tail-associated protein complexes share a common evolutionary origin. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 106, 4154–4159. <https://doi.org/10/d7h7gz>.

- LeRoux, M., Kirkpatrick, R.L., Montauti, E.I., Tran, B.Q., Peterson, S.B., Harding, B.N., et al. (2015) Kin cell lysis is a danger signal that activates antibacterial pathways of *Pseudomonas aeruginosa* Laub, M. (Ed.). *eLife*, 4, e05701. <https://doi.org/10.7554/eLife.05701>.
- Leung, K.Y., Siame, B.A., Snowball, H. & Mok, Y.-K. (2011) Type VI secretion regulation: crosstalk and intracellular communication. *Current Opinion in Microbiology*, 14, 9–15. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2010.09.017>.
- Li, C., Zhu, L., Wang, D., Wei, Z., Hao, X., Wang, Z., et al. (2022) T6SS secretes an LPS-binding effector to recruit OMVs for exploitative competition and horizontal gene transfer. *The ISME journal*, 16, 500–510. <https://doi.org/10/gpcjg9>.
- Li, L., Wang, Y.-N., Jia, H.-B., Wang, P., Dong, J.-F., Deng, J., et al. (2019) The type VI secretion system protein AsaA in *Acinetobacter baumannii* is a periplasmic protein physically interacting with TssM and required for T6SS assembly. *Scientific Reports*, 9, 9438. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-45875-9>.
- Lin, J., Xu, L., Yang, J., Wang, Z. & Shen, X. (2021) Beyond dueling: roles of the type VI secretion system in microbiome modulation, pathogenesis and stress resistance. *Stress Biology*, 1, 11. <https://doi.org/10.1007/s44154-021-00008-z>.
- Lin, J., Zhang, W., Cheng, J., Yang, X., Zhu, K., Wang, Y., et al. (2017) A *Pseudomonas* T6SS effector recruits PQS-containing outer membrane vesicles for iron acquisition. *Nature Communications*, 8, 14888. <https://doi.org/10.1038/ncomms14888>.
- Lin, J.-S., Pissaridou, P., Wu, H.-H., Tsai, M.-D., Filloux, A. & Lai, E.-M. (2018) TagF-mediated repression of bacterial type VI secretion systems involves a direct interaction with the cytoplasmic protein Fha. *Journal of Biological Chemistry*, 293, 8829–8842. <https://doi.org/10.1074/jbc.RA117.001618>.
- Lin, J.-S., Wu, H.-H., Hsu, P.-H., Ma, L.-S., Pang, Y.-Y., Tsai, M.-D., et al. (2014) Fha Interaction with phosphothreonine of TssL activates type VI secretion in *Agrobacterium tumefaciens*. *PLoS Pathogens*, 10, e1003991. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1003991>.
- Lin, L., Capozzoli, R., Ferrand, A., Plum, M., Vettiger, A. & Basler, M. (2022) Subcellular localization of Type VI secretion system assembly in response to cell–cell contact. *The EMBO Journal*, 41, e108595. <https://doi.org/10.15252/embj.2021108595>.
- Lin, L., Lezan, E., Schmidt, A. & Basler, M. (2019) Abundance of bacterial type VI secretion system components measured by targeted proteomics. *Nature Communications*, 10, 2584. <https://doi.org/10/gpcjct>.
- Lin, Y.L., Smith, S.N., Kanso, E., Septer, A.N. & Rycroft, C.H. (2023) A subcellular biochemical model for T6SS dynamics reveals winning competitive strategies. *PNAS Nexus*, 2, pgad195. <https://doi.org/10.1093/pnasnexus/pgad195>.

- Liu, H., Li, J., Carvalhais, L.C., Percy, C.D., Prakash Verma, J., Schenk, P.M., et al. (2021) Evidence for the plant recruitment of beneficial microbes to suppress soil-borne pathogens. *New Phytologist*, 229, 2873–2885. <https://doi.org/10.1111/nph.17057>.
- Liu, H., Wei, Z., Li, J., Liu, X., Zhu, L., Wang, Y., et al. (2023) A *Yersinia* T6SS effector YezP engages the hemin uptake receptor HmuR and ZnuABC for Zn²⁺ acquisition. *Applied and Environmental Microbiology*, 89, e00240-23. <https://doi.org/10.1128/aem.00240-23>.
- Liu, L., Hao, S., Lan, R., Wang, G., Xiao, D., Sun, H., et al. (2015) The type VI secretion system modulates flagellar gene expression and secretion in *Citrobacter freundii* and contributes to adhesion and cytotoxicity to host cells. *Infection and Immunity*, 83, 2596–2604. <https://doi.org/10.1128/iai.03071-14>.
- Liu, M., Wang, Heng, Liu, Y., Tian, M., Wang, Z., Shu, R.-D., et al. (2023) The phospholipase effector Tle1Vc promotes *Vibrio cholerae* virulence by killing competitors and impacting gene expression. *Gut Microbes*, 15, 2241204. <https://doi.org/10.1080/19490976.2023.2241204>.
- Liu, X., Clemens, D.L., Lee, B.-Y., Yang, X., Zhou, Z.H. & Horwitz, M.A. (2022) Atomic structure of IgID demonstrates its role as a component of the baseplate complex of the *Francisella* type VI secretion system. *mBio*, 13, e01277-22. <https://doi.org/10.1128/mbio.01277-22>.
- Liu, Y., Gao, J., Bai, Z., Wu, S., Li, X., Wang, N., et al. (2021) Unraveling mechanisms and impact of microbial recruitment on oilseed rape (*Brassica napus* L.) and the rhizosphere mediated by plant growth-promoting rhizobacteria. *Microorganisms*, 9, 161. <https://doi.org/10/gpcjgf>.
- Liu, Y., Gao, J., Wang, N., Li, X., Fang, N. & Zhuang, X. (2022) Diffusible signal factor enhances the saline-alkaline resistance and rhizosphere colonization of *Stenotrophomonas rhizophila* by coordinating optimal metabolism. *Science of The Total Environment*, 834, 155403. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2022.155403>.
- Liyanapathirana, P., Jones, J.B. & Potnis, N. (2021) A mutation of a single core gene, *tssM*, of Type VI secretion system of *Xanthomonas perforans* influences virulence, epiphytic survival and transmission during pathogenesis on tomato. *Phytopathology*, 112, 752–764. <https://doi.org/10.1094/PHYTO-02-21-0069-R>.
- Liyanapathirana, P., Wagner, N., Avram, O., Pupko, T. & Potnis, N. (2022) Phylogenetic distribution and evolution of Type VI Secretion System in the genus *Xanthomonas*. *Frontiers in Microbiology*, 13, 840308. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.840308>.
- Luo, J., Chu, X., Jie, J., Sun, Y., Guan, Q., Li, D., et al. (2023) *Acinetobacter baumannii* kills fungi via a type VI DNase effector. *mBio*, 0, e03420-22. <https://doi.org/10.1128/mbio.03420-22>.
- Ma, J., Pan, Z., Huang, J., Sun, M., Lu, C. & Yao, H. (2017a) The Hcp proteins fused with diverse extended-toxin domains represent a novel pattern of antibacterial effectors in type VI secretion systems. *Virulence*, 8, 1189–1202. <https://doi.org/10.1080/21505594.2017.1279374>.

- Ma, J., Sun, M., Dong, W., Pan, Z., Lu, C. & Yao, H. (2017b) PAAR-Rhs proteins harbor various C-terminal toxins to diversify the antibacterial pathways of type VI secretion systems. *Environmental Microbiology*, 19, 345–360. <https://doi.org/10/f9m4tj>.
- Machado, D., Maistrenko, O.M., Andrejev, S., Kim, Y., Bork, P., Patil, Kaustubh R., et al. (2021) Polarization of microbial communities between competitive and cooperative metabolism. *Nature Ecology & Evolution*, 5, 195–203. <https://doi.org/10.1038/s41559-020-01353-4>.
- Madmony, A., Chernin, L., Pleban, S., Peleg, E. & Riov, J. (2005) *Enterobacter cloacae*, an obligatory endophyte of pollen grains of Mediterranean pines. *Folia Microbiologica*, 50, 209–216. <https://doi.org/10.1007/BF02931568>.
- Manera, K., Caro, F., Li, H., Pei, T.-T., Hersch, S.J., Mekalanos, J.J., et al. (2021) Sensing of intracellular Hcp levels controls T6SS expression in *Vibrio cholerae*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 118, e2104813118. <https://doi.org/10.1073/pnas.2104813118>.
- Matsumoto, H., Fan, X., Wang, Yue, Kusstatscher, P., Duan, J., Wu, S., et al. (2021) Bacterial seed endophyte shapes disease resistance in rice. *Nature Plants*, 7, 60–72. <https://doi.org/10/ghswbj>.
- Matthey, N., Stutzmann, S., Stoudmann, C., Guex, N., Iseli, C. & Blokesch, M. (2019) Neighbor predation linked to natural competence fosters the transfer of large genomic regions in *vibrio cholerae*. *eLife*, 8, e48212. <https://doi.org/10.7554/eLife.48212>.
- Mattinen, L., Somervuo, P., Nykyri, J., Nissinen, R., Kouvonen, P., Corthals, G., et al. (2008) Microarray profiling of host-extract-induced genes and characterization of the type VI secretion cluster in the potato pathogen *Pectobacterium atrosepticum*. *Microbiology*, 154, 2387–2396. <https://doi.org/10.1099/mic.0.2008/017582-0>.
- Maude, R.B. (1996) Seedborne diseases and their control: principles and practice. *Seedborne diseases and their control: principles and practice*.
- McAtee, P.A., Brian, L., Curran, B., Linden, O. van der, Nieuwenhuizen, N.J., Chen, X., et al. (2018) Re-programming of *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae* gene expression during early stages of infection of kiwifruit. *BMC Genomics*, 19, 822. <https://doi.org/10.1186/s12864-018-5197-5>.
- Miller, K.J. & Wood, J.M. (1996) Osmoadaptation by Rhizosphere Bacteria. *Annual Review of Microbiology*, 50, 101–136. <https://doi.org/10.1146/annurev.micro.50.1.101>.
- Miller, M.B. & Bassler, B.L. (2001) Quorum sensing in bacteria. *Annual Review of Microbiology*, 55, 165–199. <https://doi.org/10.1146/annurev.micro.55.1.165>.
- Minkwitz, A. & Berg, G. (2001) Comparison of antifungal activities and 16S ribosomal DNA sequences of clinical and environmental isolates of *Stenotrophomonas maltophilia*. *Journal of Clinical Microbiology*, 39, 139–145. <https://doi.org/10.1128/jcm.39.1.139-145.2001>.

- Mitter, B., Pfaffenbichler, N., Flavell, R., Compant, S., Antonielli, L., Petric, A., et al. (2017) A new approach to modify plant microbiomes and traits by introducing beneficial bacteria at flowering into progeny seeds. *Frontiers in Microbiology*, 8, 11. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.00011>.
- Molina-Santiago, C., Pearson, J.R., Navarro, Y., Berlanga-Clavero, M.V., Caraballo-Rodriguez, A.M., Petras, D., et al. (2019) The extracellular matrix protects *Bacillus subtilis* colonies from *Pseudomonas* invasion and modulates plant co-colonization. *Nature Communications*, 10, 1919. <https://doi.org/10/gpcjcv>.
- Monjarás Fera, J. & Valvano, M.A. (2020) An overview of anti-eucaryotic effectors. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 10, 584751. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2020.584751>.
- Montenegro Benavides, N.A., Alvarez B, A., Arrieta-Ortiz, M.L., Rodriguez-R, L.M., Botero, D., Tabima, J.F., et al. (2021) The type VI secretion system of *Xanthomonas phaseoli* pv. *manihotis* is involved in virulence and *in vitro* motility. *BMC microbiology*, 21, 14. <https://doi.org/10/gpcjgk>.
- Moore, E.R.B., Krüger, A.S., Hauben, L., Seal, S.E., De Baere, R., De Wachter, R., et al. (1997) 16S rRNA gene sequence analyses and inter- and intrageneric relationships of *Xanthomonas* species and *Stenotrophomonas maltophilia*. *FEMS Microbiology Letters*, 151, 145–153. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.1997.tb12563.x>.
- Morella, N.M., Zhang, X. & Koskella, B. (2019) Tomato seed-associated bacteria confer protection of seedlings against foliar disease caused by *Pseudomonas syringae*. *Phytobiomes Journal*, 3, 177–190. <https://doi.org/10.1094/PBIOMES-01-19-0007-R>.
- Morgado, S. & Vicente, A.C. (2022) Diversity and distribution of type VI secretion system gene clusters in bacterial plasmids. *Scientific Reports*, 12, 8249. <https://doi.org/10.1038/s41598-022-12382-3>.
- Morris, B.E.L., Henneberger, R., Huber, H. & Moissl-Eichinger, C. (2013) Microbial syntrophy: interaction for the common good. *FEMS Microbiology Reviews*, 37, 384–406. <https://doi.org/10.1111/1574-6976.12019>.
- Moscoso, J.A., Mikkelsen, H., Heeb, S., Williams, P. & Filloux, A. (2011) The *Pseudomonas aeruginosa* sensor RetS switches type III and type VI secretion via c-di-GMP signalling. *Environmental Microbiology*, 13, 3128–3138. <https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2011.02595.x>.
- Mougous, J.D., Cuff, M.E., Raunser, S., Shen, A., Zhou, M., Gifford, C.A., et al. (2006) A virulence locus of *Pseudomonas aeruginosa* encodes a protein secretion apparatus. *Science*, 312, 1526–1530. <https://doi.org/10.1126/science.1128393>.
- Mougous, J.D., Gifford, C.A., Ramsdell, T.L. & Mekalanos, J.J. (2007) Threonine phosphorylation post-translationally regulates protein secretion in *Pseudomonas aeruginosa*. *Nature Cell Biology*, 9, 797–803. <https://doi.org/10.1038/ncb1605>.

- Mourou, M., Hanani, A., D'Onghia, A.M., Davino, S.W., Balestra, G.M. & Valentini, F. (2022) Antagonism and antimicrobial capacity of epiphytic and endophytic bacteria against the phytopathogen *Xylella fastidiosa*. *Agronomy*, 12, 1266. <https://doi.org/10.3390/agronomy12061266>.
- Mukherjee, P. & Roy, P. (2016) Genomic potential of *Stenotrophomonas maltophilia* in bioremediation with an assessment of its multifaceted role in our environment. *Frontiers in Microbiology*, 7, 967. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.00967>.
- Naushad, H.S. & Gupta, R.S. (2013) Phylogenomics and molecular signatures for species from the plant pathogen-containing order *Xanthomonadales*. *PLOS ONE*, 8, e55216. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0055216>.
- Nazarov, S., Schneider, J.P., Brackmann, M., Goldie, K.N., Stahlberg, H. & Basler, M. (2018) Cryo-EM reconstruction of type VI secretion system baseplate and sheath distal end. *The EMBO Journal*, 37, e97103. <https://doi.org/10/gpcjch>.
- Nelson, E.B. (2004) Microbial dynamics and interactions in the spermosphere. *Annual Review of Phytopathology*, 42, 271–309. <https://doi.org/10/c39mt2>.
- Nelson, E.B. (2018) The seed microbiome: Origins, interactions, and impacts. *Plant and Soil*, 422, 7–34. <https://doi.org/10.1007/s11104-017-3289-7>.
- Nemergut, D.R., Schmidt, S.K., Fukami, T., O'Neill, S.P., Bilinski, T.M., Stanish, L.F., et al. (2013) Patterns and processes of microbial community assembly. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 77, 342–356. <https://doi.org/10.1128/mubr.00051-12>.
- Néron, B., Denise, R., Coluzzi, C., Touchon, M., Rocha, E.P.C. & Abby, S.S. (2023) MacSyFinder v2: Improved modelling and search engine to identify molecular systems in genomes. *Peer Community Journal*, 3, e28. <https://doi.org/10.24072/pcjournal.250>.
- Nguyen, V.S., Spinelli, S., Cascales, É., Roussel, A., Cambillau, C. & Leone, P. (2021) Anchoring the T6SS to the cell wall: Crystal structure of the peptidoglycan binding domain of the TagL accessory protein. *PLOS ONE*, 16, e0254232. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0254232>.
- Olofintila, O.E. & Noel, Z.A. (2023) Soybean and cotton spermosphere soil microbiome shows dominance of soilborne copiotrophs. *Microbiology Spectrum*, 11, e00377-23. <https://doi.org/10.1128/spectrum.00377-23>.
- Opio, A.F., Allen, D.J. & Teri, J.M. (1993) Studies on seed transmission of *Xanthomonas campestris* pv. *phaseoli* in common beans in Uganda. *African Crop Science Journal*, 1, 59–67.
- Ortega-Cuadros, M., De Souza, T.L., Berruyer, R., Aligon, S., Pelletier, S., Renou, J.-P., et al. (2022) Seed transmission of pathogens: non-canonical immune response in *Arabidopsis* germinating seeds compared to early seedlings against the necrotrophic fungus *Alternaria brassicicola*. *Plants*, 11, 1708. <https://doi.org/10.3390/plants11131708>.

- Ostrowski, A., Cianfanelli, F.R., Porter, M., Mariano, G., Peltier, J., Wong, J.J., et al. (2018) Killing with proficiency: Integrated post-translational regulation of an offensive type VI secretion system. *PLoS Pathogens*, 14, e1007230. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1007230>.
- Pace, F. de, Boldrin de Paiva, J., Nakazato, G., Lancellotti, M., Sircili, M.P., Guedes Stehling, E., et al. (2011) Characterization of IcmF of the type VI secretion system in an avian pathogenic *Escherichia coli* (APEC) strain. *Microbiology (Reading, England)*, 157, 2954–2962. <https://doi.org/10.1099/mic.0.050005-0>.
- Palleroni, N.J. & Bradbury, J.F. (1993) *Stenotrophomonas*, a new bacterial genus for *Xanthomonas maltophilia* (Hugh 1980) Swings et al. 1983. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 43, 606–609. <https://doi.org/10.1099/00207713-43-3-606>.
- Patz, S., Becker, Y., Richert-Pöggeler, K.R., Berger, B., Ruppel, S., Huson, D.H., et al. (2019) Phage tail-like particles are versatile bacterial nanomachines – A mini-review. *Journal of Advanced Research*, 19, 75–84. <https://doi.org/10.1016/j.jare.2019.04.003>.
- Peduzzi, C., Butchacas, J., Roman-Reyna, V., Nikis, F., Jacobs, J., Koebnik, R., et al. (2023) Functional characterization and evolution of Type VI Secretion System in *Xanthomonas translucens*. 16th Plants Bacteria Meeting (Aussois, France (Poster)).
- Pei, T.-T., Kan, Y., Wang, Z.-H., Tang, M.-X., Li, H., Yan, S., et al. (2022) Delivery of an Rhs-family nuclease effector reveals direct penetration of the gram-positive cell envelope by a type VI secretion system in *Acidovorax citrulli*. *mLife*, 1, 66–78. <https://doi.org/10.1002/mlf2.12007>.
- Peng, M., Jiang, Z., Zhou, F. & Wang, Z. (2023) From salty to thriving: plant growth promoting bacteria as nature's allies in overcoming salinity stress in plants. *Frontiers in Microbiology*, 14, 1169809. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2023.1169809>.
- Pérez-Lorente, A.I., Molina-Santiago, C., Vicente, A. de & Romero, D. (2023) Sporulation activated via σ^W protects *Bacillus* from a Tse1 peptidoglycan hydrolase T6SS effector. *Microbiology Spectrum*, 11, e0504522. <https://doi.org/10.1128/spectrum.05045-22>.
- Peterson, S.B., Bertolli, S.K. & Mougous, J.D. (2020) The central role of interbacterial antagonism in bacterial life. *Current Biology*, 30, R1203–R1214. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2020.06.103>.
- Pinski, A., Zur, J., Hasterok, R. & Hupert-Kocurek, K. (2020) Comparative genomics of *Stenotrophomonas maltophilia* and *Stenotrophomonas rhizophila* revealed characteristic features of both species. *International Journal of Molecular Sciences*, 21, 4922. <https://doi.org/10/gpcjd7>.
- Pissaridou, P., Allsopp, L.P., Wettstadt, S., Howard, S.A., Mavridou, D.A.I. & Filloux, A. (2018) The *Pseudomonas aeruginosa* T6SS-VgrG1b spike is topped by a PAAR protein eliciting DNA damage to bacterial competitors. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 115, 12519–12524. <https://doi.org/10.1073/pnas.1814181115>.

- Prado, A., Marolleau, B., Vaissière, B.E., Barret, M. & Torres-Cortes, G. (2020) Insect pollination: an ecological process involved in the assembly of the seed microbiota. *Scientific Reports*, 10, 3575. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-60591-5>.
- Pukatzki, S., Ma, A.T., Sturtevant, D., Krastins, B., Sarracino, D., Nelson, W.C., et al. (2006) Identification of a conserved bacterial protein secretion system in *Vibrio cholerae* using the *Dictyostelium* host model system. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 103, 1528–1533. <https://doi.org/10.1073/pnas.0510322103>.
- Raio, A., Brillì, F., Neri, L., Baraldi, R., Orlando, F., Pugliesi, C., et al. (2023) *Stenotrophomonas rhizophila* Ep2.2 inhibits growth of *Botrytis cinerea* through the emission of volatile organic compounds, restricts leaf infection and primes defense genes. *Frontiers in Plant Science*, 14, 1235669. <https://doi.org/10.3389/fpls.2023.1235669>.
- Ramamoorthy, S., Pena, M., Ghosh, P., Liao, Y.-Y., Paret, M., Jones, J.B., et al. (2023) Transcriptome profiling of type VI secretion system core gene *tssM* mutant of *Xanthomonas perforans* highlights regulators controlling diverse functions ranging from virulence to metabolism. *bioRxiv*, 2023.07.13.548846. <https://doi.org/10.1101/2023.07.13.548846>.
- Rapisarda, C., Cherrak, Y., Kooger, R., Schmidt, V., Pellarin, R., Logger, L., et al. (2019) In situ and high-resolution cryo-EM structure of a bacterial type VI secretion system membrane complex. *The EMBO Journal*, 38, e100886. <https://doi.org/10.15252/embj.2018100886>.
- Reglinski, M., Monlezun, L. & Coulthurst, S.J. (2023) The accessory protein TagV is required for full Type VI secretion system activity in *Serratia marcescens*. *Molecular Microbiology*, 119, 326–339. <https://doi.org/10.1111/mmi.15027>.
- Repizo, G.D., Espariz, M., Seravalle, J.L. & Salcedo, S.P. (2019) Bioinformatic analysis of the Type VI Secretion System and its potential toxins in the *Acinetobacter* genus. *Frontiers in Microbiology*, 10, 457539. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.02519>.
- Reyes-Perez, J.J., Hernandez-Montiel, L.G., Vero, S., Noa-Carrazana, J.C., Quiñones-Aguilar, E.E. & Rincón-Enríquez, G. (2019) Postharvest biocontrol of *Colletotrichum gloeosporioides* on mango using the marine bacterium *Stenotrophomonas rhizophila* and its possible mechanisms of action. *Journal of Food Science and Technology*, 56, 4992–4999. <https://doi.org/10.1007/s13197-019-03971-8>.
- Rezki, S., Champion, C., Iacomì-Vasilescu, B., Preveaux, A., Toualbia, Y., Bonneau, S., et al. (2016) Differences in stability of seed-associated microbial assemblages in response to invasion by phytopathogenic microorganisms. *PeerJ*, 4, e1923. <https://doi.org/10/gpcjbw>.
- Rezki, S., Champion, C., Simoneau, P., Jacques, M.-A., Shade, A. & Barret, M. (2018) Assembly of seed-associated microbial communities within and across successive plant generations. *Plant and Soil*, 422, 67–79. <https://doi.org/10/gc2m2s>.

- Rezzonico, F., Binder, C., Défago, G. & Moëgne-Loccoz, Y. (2005) The Type III Secretion System of biocontrol *Pseudomonas fluorescens* KD targets the phytopathogenic *Chromista Pythium ultimum* and promotes cucumber protection. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 18, 991–1001. <https://doi.org/10.1094/MPMI-18-0991>.
- Ringel, P.D., Hu, D. & Basler, M. (2017) The role of type VI secretion system effectors in target cell lysis and subsequent horizontal gene transfer. *Cell Reports*, 21, 3927–3940. <https://doi.org/10/gk92k7>.
- Ripcke, K., Picazo, D.R., Vichare, S., Unterweger, D., Dagan, T. & Hülter, N.F. (2023) T6SS-mediated competitive exclusion among *Pantoea agglomerans* associated with plants. *bioRxiv*, 2023.03.17.533219. <https://doi.org/10.1101/2023.03.17.533219>.
- Rivas-Garcia, T., Murillo-Amador, B., Nieto-Garibay, A., Chiquito-Contreras, R.G., Rincon-Enriquez, G. & Hernandez-Montiel, L.G. (2018) Effect of ulvan on the biocontrol activity of *Debaryomyces hansenii* and *Stenotrophomonas rhizophila* against fruit rot of *Cucumis melo* L. *Agronomy*, 8, 273. <https://doi.org/10.3390/agronomy8120273>.
- Robitaille, S., Simmons, E.L., Verster, A.J., McClure, E.A., Royce, D.B., Trus, E., et al. (2023) Community composition and the environment modulate the population dynamics of type VI secretion in human gut bacteria. *Nature Ecology & Evolution*, 7, 2092–2107. <https://doi.org/10.1038/s41559-023-02230-6>.
- Rocheftort, A., Briand, M., Marais, C., Wagner, M.-H., Laperche, A., Vallée, P., et al. (2019) Influence of environment and host plant genotype on the structure and diversity of the *Brassica napus* seed microbiota. *Phytobiomes Journal*, 3, 326–336. <https://doi.org/10/ggz2g6>.
- Rocheftort, A., Simonin, M., Marais, C., Guillerm-Erckelboudt, A.-Y., Barret, M. & Sarniguet, A. (2021) transmission of seed and soil microbiota to seedling. *mSystems*, 6, e0044621. <https://doi.org/10/gnx97s>.
- Roder, A., Hoffmann, E., Hagemann, M. & Berg, G. (2005) Synthesis of the compatible solutes glucosylglycerol and trehalose by salt-stressed cells of *Stenotrophomonas* strains. *FEMS Microbiology Letters*, 243, 219–226. <https://doi.org/10.1016/j.femsle.2004.12.005>.
- Rodriguez, P.A., Rothballer, M., Chowdhury, S.P., Nussbaumer, T., Gutjahr, C. & Falter-Braun, P. (2019) Systems biology of plant-microbiome interaction. *Molecular Plant*, 12, 804–821. <https://doi.org/10/ggqrv2>.
- Roumagnac, P., Pruvost, O., Chiroleu, F. & Hughes, G. (2004) Spatial and temporal analyses of bacterial blight of onion caused by *Xanthomonas axonopodis* pv. *allii*. *Phytopathology*, 94, 138–146. <https://doi.org/10.1094/PHYTO.2004.94.2.138>.
- Rudzite, M., Subramoni, S., Endres, R.G. & Filloux, A. (2023) Effectiveness of *Pseudomonas aeruginosa* type VI secretion system relies on toxin potency and type IV pili-dependent interaction. *PLoS pathogens*, 19, e1011428. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1011428>.

- Ruhe, Z.C., Low, D.A. & Hayes, C.S. (2013) Bacterial contact-dependent growth inhibition. *Trends in Microbiology*, 21, 230–237. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2013.02.003>.
- Russel, J., Røder, H.L., Madsen, J.S., Burmølle, M. & Sørensen, S.J. (2017) Antagonism correlates with metabolic similarity in diverse bacteria. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 114, 10684–10688. <https://doi.org/10/gb2n4v>.
- Russell, A.B., LeRoux, M., Hathazi, K., Agnello, D.M., Ishikawa, T., Wiggins, P.A., et al. (2013) Diverse type VI secretion phospholipases are functionally plastic antibacterial effectors. *Nature*, 496, 508–512. <https://doi.org/10.1038/nature12074>.
- Russell, A.B., Wexler, A.G., Harding, B.N., Whitney, J.C., Bohn, A.J., Goo, Y.A., et al. (2014) A type VI secretion-related pathway in bacteroidetes mediates interbacterial antagonism. *Cell Host & Microbe*, 16, 227–236. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2014.07.007>.
- Salinero-Lanzarote, A., Pacheco-Moreno, A., Domingo-Serrano, L., Durán, D., Ormeño-Orrillo, E., Martínez-Romero, E., et al. (2019) The Type VI secretion system of *Rhizobium etli* Mim1 has a positive effect in symbiosis. *FEMS Microbiology Ecology*, 95. <https://doi.org/10/gpcjc5>.
- Sana, T.G., Baumann, C., Merdes, A., Soscia, C., Rattei, T., Hachani, A., et al. (2015) Internalization of *Pseudomonas aeruginosa* strain PAO1 into epithelial cells is promoted by interaction of a T6SS effector with the microtubule network. *mBio*, 6, e00712. <https://doi.org/10.1128/mBio.00712-15>.
- Santin, Y.G., Camy, C.E., Zoued, A., Doan, T., Aschtgen, M.-S. & Cascales, E. (2019a) Role and recruitment of the TagL peptidoglycan-binding protein during Type VI Secretion System biogenesis. *Journal of Bacteriology*, 201, e00173-19. <https://doi.org/10.1128/JB.00173-19>.
- Santin, Y.G., Doan, T., Journet, L. & Cascales, E. (2019b) Cell width dictates type VI secretion tail length. *Current Biology*, 29, 3707-3713.e3. <https://doi.org/10/gk92mh>.
- Sá-Pessoa, J., López-Montesino, S., Przybyszewska, K., Rodríguez-Escudero, I., Marshall, H., Ova, A., et al. (2023) A trans-kingdom T6SS effector induces the fragmentation of the mitochondrial network and activates innate immune receptor NLRX1 to promote infection. *Nature Communications*, 14, 871. <https://doi.org/10.1038/s41467-023-36629-3>.
- Sarris, P.F., Ladoukakis, E.D., Panopoulos, N.J. & Scoulica, E.V. (2014) A phage tail-derived element with wide distribution among both prokaryotic domains: a comparative genomic and phylogenetic study. *Genome Biology and Evolution*, 6, 1739–1747. <https://doi.org/10.1093/gbe/evu136>.
- Sastry, K.S. (2013) Seed-borne plant virus diseases. (India: Springer).
- Schmidt, C.S., Alavi, M., Cardinale, M., Müller, H. & Berg, G. (2012) *Stenotrophomonas rhizophila* DSM14405T promotes plant growth probably by altering fungal communities in the rhizosphere. *Biology and Fertility of Soils*, 48, 947–960. <https://doi.org/10/f4cz74>.

- Septer, A.N., Sharpe, G. & Shook, E.A. (2023) The *Vibrio fischeri* type VI secretion system incurs a fitness cost under host-like conditions. *bioRxiv*, 2023.03.07.529561. <https://doi.org/10.1101/2023.03.07.529561>.
- Seth, E.C. & Taga, M.E. (2014) Nutrient cross-feeding in the microbial world. *Frontiers in Microbiology*, 5, 350. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2014.00350>.
- Shade, A. & Handelsman, J. (2012) Beyond the Venn diagram: the hunt for a core microbiome. *Environmental Microbiology*, 14, 4–12. <https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2011.02585.x>.
- Shade, A., Jacques, M.-A. & Barret, M. (2017) Ecological patterns of seed microbiome diversity, transmission, and assembly. *Current Opinion in Microbiology*, 37, 15–22. <https://doi.org/10/gcn64p>.
- Shao, X., Wu, Q., Li, L., He, W., He, X., Cheng, D., et al. (2023) Adapting the inoculation methods of kiwifruit canker disease to identify efficient biocontrol bacteria from branch microbiome. *Molecular Plant Pathology*, 25, e13399. <https://doi.org/10.1111/mpp.13399>.
- Shikuma, N.J., Pilhofer, M., Weiss, G.L., Hadfield, M.G., Jensen, G.J. & Newman, D.K. (2014) Marine tubeworm metamorphosis induced by arrays of bacterial phage tail-like structures. *Science*, 343, 529–533. <https://doi.org/10.1126/science.1246794>.
- Shneider, M.M., Buth, S.A., Ho, B.T., Basler, M., Mekalanos, J.J. & Leiman, P.G. (2013) PAAR-repeat proteins sharpen and diversify the type VI secretion system spike. *Nature*, 500, 350–353. <https://doi.org/10.1038/nature12453>.
- Si, M., Wang, Y., Zhang, B., Zhao, C., Kang, Y., Bai, H., et al. (2017a) The Type VI Secretion System engages a redox-regulated dual-functional heme transporter for zinc acquisition. *Cell Reports*, 20, 949–959. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2017.06.081>.
- Si, M., Zhao, C., Burkinshaw, B., Zhang, B., Wei, D., Wang, Y., et al. (2017b) Manganese scavenging and oxidative stress response mediated by type VI secretion system in *Burkholderia thailandensis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 114, E2233–E2242. <https://doi.org/10/f9wnf2>.
- Sicard, A., Zeilinger, A.R., Vanhove, M., Schartel, T.E., Beal, D.J., Daugherty, M.P., et al. (2018) *Xylella fastidiosa*: insights into an emerging plant pathogen. *Annual Review of Phytopathology*, 56, 181–202. <https://doi.org/10.1146/annurev-phyto-080417-045849>.
- Silambarasan, S., Logeswari, P., Ruiz, A., Cornejo, P. & Kannan, V.R. (2020) Influence of plant beneficial *Stenotrophomonas rhizophila* strain CASB3 on the degradation of diuron-contaminated saline soil and improvement of *Lactuca sativa* growth. *Environmental Science and Pollution Research*, 27, 35195–35207. <https://doi.org/10.1007/s11356-020-09722-z>.
- Simonin, M., Briand, M., Chesneau, G., Rochefort, A., Marais, C., Sarniguet, A., et al. (2022) Seed microbiota revealed by a large-scale meta-analysis including 50 plant species. *New Phytologist*, 234, 1448–1463. <https://doi.org/10.1111/nph.18037>.

- Simonin, M., Prévieux, A., Marais, C., Garin, T., Arnault, G., Sarniguet, A., et al. (2023) Transmission of synthetic seed bacterial communities to radish seedlings: impact on microbiota assembly and plant phenotype. *Peer Community Journal*, 3, e95. <https://doi.org/10.24072/pcjournal.329>.
- Singh, S., Dey, S.S., Bhatia, R., Batley, J. & Kumar, R. (2018) Molecular breeding for resistance to black rot [*Xanthomonas campestris* pv. *campestris* (Pammel) Dowson] in Brassicas: recent advances. *Euphytica*, 214, 196. <https://doi.org/10.1007/s10681-018-2275-3>.
- Smith, P. & Schuster, M. (2019) Public goods and cheating in microbes. *Current biology: CB*, 29, R442–R447. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2019.03.001>.
- Smith, W.P.J., Brodmann, M., Unterweger, D., Davit, Y., Comstock, L.E., Basler, M., et al. (2020a) The evolution of tit-for-tat in bacteria via the type VI secretion system. *Nature Communications*, 11, 5395. <https://doi.org/10/gpcjfc>.
- Smith, W.P.J., Vettiger, A., Winter, J., Ryser, T., Comstock, L.E., Basler, M., et al. (2020b) The evolution of the type VI secretion system as a disintegration weapon. *PLOS Biology*, 18, e3000720. <https://doi.org/10/gpcjfd>.
- Song, L., Pan, J., Yang, Y., Zhang, Z., Cui, R., Jia, S., et al. (2021) Contact-independent killing mediated by a T6SS effector with intrinsic cell-entry properties. *Nature Communications*, 12, 423. <https://doi.org/10/gpcjgp>.
- Song, L., Xu, L., Wu, T., Shi, Z., Kareem, H.A., Wang, Z., et al. (2024) Trojan horse-like T6SS effector TepC mediates both interference competition and exploitative competition. *The ISME Journal*, 18, wrad028. <https://doi.org/10.1093/ismejo/wrad028>.
- Souza, D.P., Oka, G.U., Alvarez-Martinez, C.E., Bisson-Filho, A.W., Dunger, G., Hobeika, L., et al. (2015) Bacterial killing via a type IV secretion system. *Nature Communications*, 6, 6453. <https://doi.org/10.1038/ncomms7453>.
- Speare, L., Woo, M., Bultman, K.M., Mandel, M.J., Wollenberg, M.S. & Septer, A.N. (2021) Host-like conditions are required for T6SS-mediated competition among *Vibrio fischeri* light organ symbionts. *mSphere*, 6, e0128820. <https://doi.org/10.1128/mSphere.01288-20>.
- Speare, L., Woo, M., Dunn, A.K. & Septer, A.N. (2022) A putative lipoprotein mediates cell-cell contact for type VI secretion system-dependent killing of specific competitors. *mBio*, 13, e0308521. <https://doi.org/10.1128/mbio.03085-21>.
- Stams, A.J.M. & Plugge, C.M. (2009) Electron transfer in syntrophic communities of anaerobic bacteria and archaea. *Nature Reviews Microbiology*, 7, 568–577. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2166>.
- Steinbach, G., Crisan, C., Ng, S.L., Hammer, B.K. & Yunker, P.J. (2020) Accumulation of dead cells from contact killing facilitates coexistence in bacterial biofilms. *Journal of The Royal Society Interface*, 17, 20200486. <https://doi.org/10/gpcjff>.

- Stolle, A.-S., Meader, B.T., Toska, J. & Mekalanos, J.J. (2021) Endogenous membrane stress induces T6SS activity in *Pseudomonas aeruginosa*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 118, e2018365118. <https://doi.org/10.1073/pnas.2018365118>.
- Storey, D., McNally, A., Åstrand, M., Santos, J. sa-P.G., Rodriguez-Escudero, I., Elmore, B., et al. (2020) *Klebsiella pneumoniae* type VI secretion system-mediated microbial competition is PhoPQ controlled and reactive oxygen species dependent. *PLOS Pathogens*, 16, e1007969. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1007969>.
- Suckstorff, I. & Berg, G. (2003) Evidence for dose-dependent effects on plant growth by *Stenotrophomonas* strains from different origins. *Journal of Applied Microbiology*, 95, 656–663. <https://doi.org/10/c755t9>.
- Sun, S., Zhang, K., Wu, Y., Wang, Y., Chen, J. & Leng, F. (2021) Physiological and genetic response characteristics of *Stenotrophomonas rhizophila* JC1 under heavy metal stress. Research Square; 2021. <https://doi.org/10.21203/rs.3.rs-749120/v1>.
- Sun, Y., LaSota, E.D., Cecere, A.G., LaPenna, K.B., Larios-Valencia, J., Wollenberg, M.S., et al. (2016) Intraspecific competition impacts *Vibrio fischeri* strain diversity during initial colonization of the squid light organ. *Applied and Environmental Microbiology*, 82, 3082–3091. <https://doi.org/10.1128/AEM.04143-15>.
- Taffner, J., Bergna, A., Cernava, T. & Berg, G. (2020) Tomato-associated archaea show a cultivar-specific rhizosphere effect but an unspecific transmission by seeds. *Phytobiomes Journal*, 4, 133–141. <https://doi.org/10.1094/PBIOMES-01-20-0017-R>.
- Taillefer, B., Giraud, J.F. & Cascales, E. (2023) No fitness cost entailed by type VI secretion system synthesis, assembly, contraction, or disassembly in enteroaggregative *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*, 205, e0035723. <https://doi.org/10.1128/jb.00357-23>.
- Tatenhove-Pel, R.J. van, Rijavec, T., Lapanje, A., Swam, I. van, Zwering, E., Hernandez-Valdes, J.A., et al. (2021) Microbial competition reduces metabolic interaction distances to the low μm -range. *The ISME Journal*, 15, 688–701. <https://doi.org/10.1038/s41396-020-00806-9>.
- Taylor, N.M.I., Raaij, M.J. van & Leiman, P.G. (2018) Contractile injection systems of bacteriophages and related systems. *Molecular Microbiology*, 108, 6–15. <https://doi.org/10.1111/mmi.13921>.
- Thines, M. (2014) Phylogeny and evolution of plant pathogenic oomycetes—a global overview. *European Journal of Plant Pathology*, 138, 431–447. <https://doi.org/10.1007/s10658-013-0366-5>.
- Thomas, J., Watve, S.S., Ratcliff, W.C. & Hammer, B.K. (2017) Horizontal gene transfer of functional type vi killing genes by natural transformation. *mBio*, 8, e00654-17. <https://doi.org/10.1128/mBio.00654-17>.

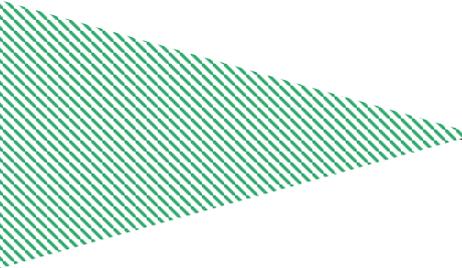
- Tian, Y., Zhao, Y., Wu, X., Liu, F., Hu, B. & Walcott, R.R. (2015) The type VI protein secretion system contributes to biofilm formation and seed-to-seedling transmission of *Acidovorax citrulli* on melon. *Molecular Plant Pathology*, 16, 38–47. <https://doi.org/10/gpcjbs>.
- Tian, Y., Zhao, Yuqiang, Shi, L., Cui, Z., Hu, B. & Zhao, Youfu (2017) Type VI secretion systems of *Erwinia amylovora* contribute to bacterial competition, virulence, and exopolysaccharide production. *Phytopathology*, 107, 654–661. <https://doi.org/10.1094/PHYTO-11-16-0393-R>.
- Tiburcio, A.F. & Alcázar, R. (2018) Potential applications of polyamines in agriculture and plant biotechnology. *Methods in Molecular Biology* (Clifton, N.J.), 1694, 489–508. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-7398-9_40.
- Tighilt, L., Boulila, F., De Sousa, B.F.S., Giraud, E., Ruiz-Argüeso, T., Palacios, J.M., et al. (2022) The *Bradyrhizobium* sp. LmicA16 type VI secretion system is required for efficient nodulation of *Lupinus* spp. *Microbial Ecology*, 84, 844–855. <https://doi.org/10.1007/s00248-021-01892-8>.
- Timilsina, S., Potnis, N., Newberry, E.A., Liyanapathirana, P., Iruegas-Bocardo, F., White, F.F., et al. (2020) *Xanthomonas* diversity, virulence and plant–pathogen interactions. *Nature Reviews Microbiology*, 18, 415–427. <https://doi.org/10.1038/s41579-020-0361-8>.
- Torres-Cortés, G., Garcia, B.J., Compant, S., Rezki, S., Jones, P., Préveaux, A., et al. (2019) Differences in resource use lead to coexistence of seed-transmitted microbial populations. *Scientific Reports*, 9, 1–13. <https://doi.org/10/gn57rf>.
- Toska, J., Ho, B.T. & Mekalanos, J.J. (2018) Exopolysaccharide protects *Vibrio cholerae* from exogenous attacks by the type 6 secretion system. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 115, 7997–8002. <https://doi.org/10/gd2hbq>.
- Toyofuku, M., Schild, S., Kaparakis-Liaskos, M. & Eberl, L. (2023) Composition and functions of bacterial membrane vesicles. *Nature Reviews Microbiology*, 21, 415–430. <https://doi.org/10.1038/s41579-023-00875-5>.
- Trifonova, A. & Strateva, T. (2019) *Stenotrophomonas maltophilia* – a low-grade pathogen with numerous virulence factors. *Infectious Diseases*, 51, 168–178. <https://doi.org/10.1080/23744235.2018.1531145>.
- Trivedi, P., Leach, J.E., Tringe, S.G., Sa, T. & Singh, B.K. (2020) Plant–microbiome interactions: from community assembly to plant health. *Nature Reviews Microbiology*, 1–15. <https://doi.org/10/ghjqn>.
- Troselj, V., Treuner-Lange, A., Søggaard-Andersen, L. & Wall, D. (2018) Physiological heterogeneity triggers sibling conflict mediated by the type VI secretion system in an aggregative multicellular bacterium. *mBio*, 9, e01645-17. <https://doi.org/10.1128/mBio.01645-17>.
- Trunk, K., Coulthurst, S.J. & Quinn, J. (2019) A new front in microbial warfare—delivery of antifungal effectors by the Type VI Secretion System. *Journal of Fungi*, 5, 50. <https://doi.org/10.3390/jof5020050>.

- Trunk, K., Peltier, J., Liu, Y.-C., Dill, B.D., Walker, L., Gow, N.A.R., et al. (2018) The type VI secretion system deploys antifungal effectors against microbial competitors. *Nature Microbiology*, 3, 920–931. <https://doi.org/10/gmpvgs>.
- Unni, R., Pintor, K.L., Diepold, A. & Unterweger, D. (2022) Presence and absence of type VI secretion systems in bacteria. *Microbiology*, 168, 001151. <https://doi.org/10.1099/mic.0.001151>.
- Van Der Wolf, J.M. & Van Der Zouwen, P.S. (2010) Colonization of cauliflower blossom (*Brassica oleracea*) by *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*, via flies (*Calliphora vomitoria*) can result in seed infestation. *Journal of Phytopathology*, 158, 726–732. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0434.2010.01690.x>.
- Vančura, V. & Hanzlíková, A. (1972) Root Exudates of plants: iv. differences in chemical composition of seed and seedlings exudates. *Plant and Soil*, 36, 271–282.
- Vassallo, C.N., Cao, P., Conklin, A., Finkelstein, H., Hayes, C.S. & Wall, D. (2017) Infectious polymorphic toxins delivered by outer membrane exchange discriminate kin in myxobacteria Laub, M.T. (Ed.). *eLife*, 6, e29397. <https://doi.org/10.7554/eLife.29397>.
- Vellend, M. (2010) Conceptual synthesis in community ecology. *The Quarterly Review of Biology*, 85, 183–206. <https://doi.org/10/bg63tm>.
- Vespermann, A., Kai, M. & Piechulla, B. (2007) Rhizobacterial volatiles affect the growth of fungi and *Arabidopsis thaliana*. *Applied and Environmental Microbiology*, 73, 5639–5641. <https://doi.org/10.1128/AEM.01078-07>.
- Vettiger, A. & Basler, M. (2016) Type VI secretion system substrates are transferred and reused among sister cells. *Cell*, 167, 99–110.e12. <https://doi.org/10/f88ws2>.
- Vettiger, A., Winter, J., Lin, L. & Basler, M. (2017) The type VI secretion system sheath assembles at the end distal from the membrane anchor. *Nature Communications*, 8, 16088. <https://doi.org/10.1038/ncomms16088>.
- Walitang, D.I., Kim, K., Madhaiyan, M., Kim, Y.K., Kang, Y. & Sa, T. (2017) Characterizing endophytic competence and plant growth promotion of bacterial endophytes inhabiting the seed endosphere of rice. *BMC Microbiology*, 17, 209. <https://doi.org/10.1186/s12866-017-1117-0>.
- Walsh, C.M., Becker-Uncapher, I., Carlson, M. & Fierer, N. (2021) Variable influences of soil and seed-associated bacterial communities on the assembly of seedling microbiomes. *The ISME Journal*, 15, 2748–2762. <https://doi.org/10.1038/s41396-021-00967-1>.
- Wang, J., Brackmann, M., Castaño-Díez, D., Kudryashev, M., Goldie, K.N., Maier, T., et al. (2017) Cryo-EM structure of the extended type VI secretion system sheath–tube complex. *Nature Microbiology*, 2, 1507–1512. <https://doi.org/10.1038/s41564-017-0020-7>.

- Wang, J., Brodmann, M. & Basler, M. (2019) Assembly and subcellular localization of bacterial Type VI Secretion Systems. *Annual Review of Microbiology*, 73, 621–638. <https://doi.org/10.1146/annurev-micro-020518-115420>.
- Wang, L., Xi, N., Lang, D., Zhou, L., Zhang, Y. & Zhang, X. (2022) Potential biocontrol and plant growth promotion of an endophytic bacteria isolated from *Glycyrrhiza uralensis* seeds. *Egyptian Journal of Biological Pest Control*, 32, 55. <https://doi.org/10.1186/s41938-022-00556-0>.
- Wang, N., Han, N., Tian, R., Chen, J., Gao, X., Wu, Z., et al. (2021) Role of the type VI secretion system in the pathogenicity of *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae*, the causative agent of kiwifruit bacterial canker. *Frontiers in Microbiology*, 12.
- Wang, S., Yang, D., Wu, X., Yi, Z., Wang, Y., Xin, S., et al. (2019) The ferric uptake regulator represses type VI secretion system function by binding directly to the *clpV* promoter in *Salmonella enterica* serovar *typhimurium*. *Infection and Immunity*, 87, e00562-19. <https://doi.org/10.1128/IAI.00562-19>.
- Wang, S.-C., Chen, A.-P., Chou, S.-J., Kuo, C.-H. & Lai, E.-M. (2023) Soil inoculation and blocker-mediated sequencing show effects of the antibacterial T6SS on Agrobacterial tumorigenesis and gallobiome. *mBio*, 14, e00177-23. <https://doi.org/10.1128/mbio.00177-23>.
- Wang, Y., Gong, J., Guan, Y., Zhao, Z., Cai, Y. & Shan, X. (2023) Hcp1 regulates flagella of *Aeromonas veronii* TH0426 to reduce virulence. *Aquaculture*, 576, 739899. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2023.739899>.
- Wang, Y., He, T., Shen, Z. & Wu, C. (2018) Antimicrobial resistance in *Stenotrophomonas* spp. *Microbiology Spectrum*, 6. <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.ARBA-0005-2017>.
- Weber, B.S., Hennon, S.W., Wright, M.S., Scott, N.E., Berardinis, V. de, Foster, L.J., et al. (2016) Genetic dissection of the type VI secretion system in *Acinetobacter* and identification of a novel peptidoglycan hydrolase, Tagx, required for its biogenesis. *mBio*, 7, e01253-16. <https://doi.org/10.1128/mBio.01253-16>.
- Weber, B.S., Ly, P.M., Irwin, J.N., Pukatzki, S. & Feldman, M.F. (2015) A multidrug resistance plasmid contains the molecular switch for type VI secretion in *Acinetobacter baumannii*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 112, 9442–9447. <https://doi.org/10.1073/pnas.1502966112>.
- West, S.A., Griffin, A.S. & Gardner, A. (2007) Social semantics: altruism, cooperation, mutualism, strong reciprocity and group selection. *Journal of Evolutionary Biology*, 20, 415–432. <https://doi.org/10.1111/j.1420-9101.2006.01258.x>.
- West, S.A., Griffin, A.S., Gardner, A. & Diggle, S.P. (2006) Social evolution theory for microorganisms. *Nature Reviews Microbiology*, 4, 597–607. <https://doi.org/10.1038/nrmicro1461>.
- Wolf, A., Fritze, A., Hagemann, M. & Berg, G. (2002) *Stenotrophomonas rhizophila* sp. nov., a novel plant-associated bacterium with antifungal properties. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 52, 1937–1944. <https://doi.org/10/gpcjbm>.

- Wolf, J. van der, Kastelein, P., Silva Júnior, T.A.F. da, Lelis, F.V. & Zouwen, P. van der (2019) Colonization of siliques and seeds of rapid cycling *Brassica oleracea* plants by *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* after spray-inoculation of flower clusters. *European Journal of Plant Pathology*, 154, 445–461. <https://doi.org/10.1007/s10658-019-01668-4>.
- Wu, C.-F., Lin, J.-S., Shaw, G.-C. & Lai, E.-M. (2012) Acid-induced type VI secretion system is regulated by ExoR-ChvG/ChvI signaling cascade in *Agrobacterium tumefaciens*. *PLoS pathogens*, 8, e1002938. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1002938>.
- Xiong, X., Wan, W., Ding, B., Cai, M., Lu, M. & Liu, W. (2024) Type VI secretion system drives bacterial diversity and functions in multispecies biofilms. *Microbiological Research*, 279, 127570. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2023.127570>.
- Yang, G., Dowling, A.J., Gerike, U., Constant, R.H. French- & Waterfield, N.R. (2006) *Photorhabdus* virulence cassettes confer injectable insecticidal activity against the wax moth. *Journal of Bacteriology*, 188, 2254–2261. <https://doi.org/10.1128/jb.188.6.2254-2261.2006>.
- Yang, Y., Pan, D., Tang, Y., Li, J., Zhu, K., Yu, Z., et al. (2022) H3-T6SS of *Pseudomonas aeruginosa* PA14 contributes to environmental adaptation via secretion of a biofilm-promoting effector. *Stress Biology*, 2, 55. <https://doi.org/10.1007/s44154-022-00078-7>.
- Yin, M., Yan, Z. & Li, X. (2019) Architecture of type VI secretion system membrane core complex. *Cell Research*, 29, 251–253. <https://doi.org/10.1038/s41422-018-0130-7>.
- Zelezniak, A., Andrejev, S., Ponomarova, O., Mende, D.R., Bork, P. & Patil, K.R. (2015) Metabolic dependencies drive species co-occurrence in diverse microbial communities. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 112, 6449–6454. <https://doi.org/10.1073/pnas.1421834112>.
- Zhalnina, K., Louie, K.B., Hao, Z., Mansoori, N., Rocha, U.N. da, Shi, S., et al. (2018) Dynamic root exudate chemistry and microbial substrate preferences drive patterns in rhizosphere microbial community assembly. *Nature Microbiology*, 3, 470–480. <https://doi.org/10.1038/s41564-018-0129-3>.
- Zhang, C., Ratcliff, William C., & Hammer, Brian K. (2023) Constitutive expression of the type VI secretion system carries no measurable fitness cost in *Vibrio cholerae*. *bioRxiv*, 2023.03.24.534098. <https://doi.org/10.1101/2023.03.24.534098>.
- Zhang, J., Guan, J., Wang, M., Li, G., Djordjevic, M., Tai, C., et al. (2023) SecReT6 update: a comprehensive resource of bacterial type VI secretion systems. *Science China. Life Sciences*, 66, 626–634. <https://doi.org/10.1007/s11427-022-2172-x>
- Zhang, L., Xu, Jingsheng, Xu, Jin, Chen, K., He, L. & Feng, J. (2012) TssM is essential for virulence and required for type VI secretion in *Ralstonia solanacearum*. *Journal of Plant Diseases and Protection*, 119, 125–134. <https://doi.org/10.1007/BF03356431>.

- Zhang, L., Xu, Jingsheng, Xu, Jin, Zhang, H., He, L. & Feng, J. (2014) TssB is essential for virulence and required for Type VI secretion system in *Ralstonia solanacearum*. *Microbial Pathogenesis*, 74, 1–7. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2014.06.006>.
- Zhuang, X., Liu, Y., Fang, N., Bai, Z. & Gao, J. (2023) Quorum sensing improves the plant growth-promoting ability of *Stenotrophomonas rhizophila* under saline-alkaline stress by enhancing its environmental adaptability. *Frontiers in Microbiology*, 14, 1155081. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2023.1155081>.
- Zoued, A., Durand, E., Brunet, Y.R., Spinelli, S., Douzi, B., Guzzo, M., et al. (2016) Priming and polymerization of a bacterial contractile tail structure. *Nature*, 531, 59–63. <https://doi.org/10.1038/nature17182>.



ARTICLE ANNEXE

Transmission de communautés bactériennes synthétiques aux plantules de radis : impact sur l'assemblage du microbiote et le phénotype de la plante.

Marie Simonin¹ | Anne Préveaux¹ | Coralie Marais¹ | Tiffany Garin¹ | Gontran Arnaud¹ | Alain Sarniguet¹ | Matthieu Barret¹

¹ Univ Angers, Institut Agro, INRAE, IRHS, SFR QUASAV, F-49000 Angers, France

RESUME

Les microorganismes présents dans les graines peuvent être des taxons pionniers lors de la germination et de l'émergence des plantules. Cependant, l'identité et les effets phénotypiques de ces taxons qui constituent l'inoculum primaire du microbiote des plantes sont en grande partie inconnus. Dans cette étude, nous avons étudié la transmission des bactéries des graines de radis aux plantules en inoculant des souches individuelles originaires du microbiote des graines et des communautés synthétiques (SynComs) en conditions *in vitro*. Les SynComs étaient composées de taxons bactériens soit très abondants et prévalents, soit sub-dominants, soit rares au niveau des graines. Nous avons suivi la transmission de chaque souche seule ou en communautés en utilisant le séquençage d'amplicons du gène *gyrB*. Nous avons également évalué leur impact sur la germination et le phénotype des plantules. Toutes les souches et les SynComs ont réussi à coloniser les plantules, et nous avons pu reconstituer un gradient de richesse (6, 8 et 12 souches) à la fois sur les graines et les plantules. *Stenotrophomonas rhizophila* est devenue dominante sur les plantules des trois SynComs, mais la transmission de la plupart des souches avait un succès variable (c'est-à-dire qu'elle augmentait, restait stable ou diminuait pendant la transition de la graine à la plantule), dépendant également de la richesse des SynComs. La plupart des souches individuelles n'avaient aucun effet sur le phénotype des plantules, à l'exception de *Pseudomonas viridiflava* et de *Paenibacillus sp.*, qui avaient des effets néfastes sur la germination et le développement des plantules. Des morphologies anormales des plantules ont également été observées avec les SynComs, mais leur proportion diminuait à des niveaux de richesse élevés. Fait intéressant, certaines souches bactériennes précédemment identifiées comme faisant partie du noyau des taxons des graines de radis (*Pseudomonas viridiflava*, *Erwinia persicina*) étaient associées à des effets néfastes sur le phénotype des plantules, que ce soit en inoculation individuelle ou dans les SynComs. Ces résultats confirment que le microbiote de base des plantes comprend des taxons pathogènes, et non seulement des taxons commensaux ou mutualistes. Dans l'ensemble, ces résultats montrent que l'inoculation par SynCom peut efficacement manipuler la diversité du microbiote des graines et des plantules, et représente ainsi un outil prometteur pour mieux comprendre les premières étapes de l'assemblage du microbiote des plantes. Cette étude met également en évidence de fortes différences entre les taxons natifs présents dans les graines en ce qui concerne la colonisation et la survie dans les habitats plantes.

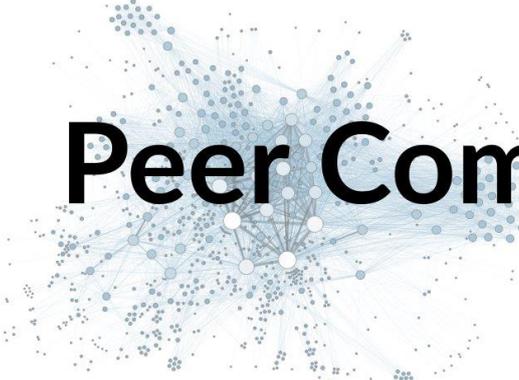
Notes

Dans cette étude, la transmission de souches individuelles et de SynComs, ainsi que leur impact sur le phénotype des plantules ont été étudiés au niveau du radis. Parmi les souches bactériennes testées, *S. rhizophila* CFBP13503.

Les résultats de cette étude ont permis de mettre en évidence que lorsque *S. rhizophila* CFBP13503 est inoculée seule au niveau des graines de radis, elle se transmet efficacement et n'a pas d'impact négatif sur le phénotype des plantules.

Lorsque *S. rhizophila* CFBP13503 est inocuées en cosortia de 6, 8 et 12 bactéries au niveau des graines de radis, elle se transmet très efficacement aux plantules et ce, malgré une faible colonisation des graines.

Ces résultats, obtenus en amont de mes travaux de thèse, ont appuyer notre choix de *S. rhizophila* CFBP13503 comme modèle d'étude. Et si la forte efficacité de transmission de cette souche était dû à son T6SS ?



Peer Community Journal

Section: Microbiology

RESEARCH ARTICLE

Published
2023-10-04

Cite as

Marie Simonin, Anne Préveaux,
Coralie Marais, Tiffany Garin,
Gontran Arnault, Alain
Sarniguet and Matthieu Barret
(2023) *Transmission of synthetic
seed bacterial communities to
radish seedlings: impact on
microbiota assembly and plant
phenotype*, Peer Community
Journal, 3: e95.

Correspondence

marie.simonin@inrae.fr

Peer-review

Peer reviewed and
recommended by

PCI Microbiology,

[https://doi.org/10.24072/pci.
microbiol.100008](https://doi.org/10.24072/pci.microbiol.100008)



This article is licensed
under the Creative Commons
Attribution 4.0 License.

Transmission of synthetic seed bacterial communities to radish seedlings: impact on microbiota assembly and plant phenotype

Marie Simonin ¹, Anne Préveaux¹, Coralie Marais¹,
Tiffany Garin¹, Gontran Arnault ¹, Alain
Sarniguet ¹, and Matthieu Barret ¹

Volume 3 (2023), article e95

<https://doi.org/10.24072/pcjournal.329>

Abstract

Seed-borne microorganisms can be pioneer taxa during germination and seedling emergence. Still, the identity and phenotypic effects of these taxa that constitute a primary inoculum of plant microbiota is mostly unknown. Here, we studied the transmission of bacteria from radish seeds to seedlings using the inoculation of individual seed-borne strains and synthetic communities (SynComs) under *in vitro* conditions. The SynComs were composed of highly abundant and prevalent, sub-dominant, or rare bacterial seed taxa. We monitored the transmission of each strain alone or in communities using *gyrB* gene amplicon sequencing and assessed their impacts on germination and seedling phenotype. All strains and SynComs successfully colonized seedlings and we were able to reconstruct a richness gradient (6, 8 and 12 strains) on both seeds and seedlings. *Stenotrophomonas rhizophila* became dominant on seedlings of the three SynComs but most strains had variable transmission success (i.e increasing, stable or decreasing during seed to seedling transition) that also depended on the SynCom richness. Most individual strains had no effect on seedling phenotypes, with the exception of *Pseudomonas viridiflava* and *Paenibacillus sp.* which had detrimental effects on germination and seedling development. Abnormal seedling morphologies were also observed with SynComs but their proportions decreased at the highest richness level. Interestingly, some bacterial strains previously identified as core taxa of radish seeds (*Pseudomonas viridiflava*, *Erwinia persicina*) were associated with detrimental effects on seedling phenotypes either in isolation or in SynComs. These results confirm that the plant core microbiome includes pathogenic and not only commensal or mutualistic taxa. Altogether, these results show that SynCom inoculation can effectively manipulate seed and seedling microbiota diversity and thus represents a promising tool to better understand the early stages of plant microbiota assembly. This study also highlights strong differences between native seed-borne taxa in the colonization and survival on plant habitats.

¹Univ Angers, Institut Agro, INRAE, IRHS, SFR QUASAV, F-49000 Angers, France

Introduction

The impact of seed-borne pathogens on plant fitness has been extensively studied but the influence of all the other commensal or mutualistic microorganisms living on/in seeds is mostly unknown. Seed microbiota harbor diverse microbial communities that constitute a primary inoculum for plant microbiota assembly that could originate from maternal transmission or environmental sources during seed maturation (Chesneau et al., 2020, 2022). Several individual seed endophytic bacteria, such as methylotrophic taxa, have been reported to promote stress tolerance and germination (Raja et al., 2019; Kumar et al., 2019). However, the research is still scarce on the influence of complex seed microbial communities on germination and seedling phenotypes or on the role of microbial interactions in the observed phenotypes (Lamichhane et al., 2018). Moreover, many knowledge gaps remain regarding the fraction of seed-borne taxa that can be transmitted to seedlings and the influence of the initial seed microbiota composition on their transmission success.

Few studies investigated the transmission of seed microbiota to seedlings and they reported a high variability in the contribution of seed taxa to plant microbiota depending on the soil tested (Rocheffort et al., 2021; Walsh et al., 2021). These studies had the advantage to work directly on native seed communities but this comes with the limitation that the seed microbiota had to be characterized on pools of seeds due to the insufficient microbial biomass and DNA present on individual seeds. As a consequence, it is not possible to truly determine which microbial taxa were transmitted from one seed to one seedling. Few studies attempted to characterize the microbiota of individual seeds using culture-dependent (Mundt & Hinkle, 1976; Newcombe et al., 2018) and culture-independent techniques (Bintarti et al., 2021; Chesneau et al., 2022). These studies demonstrated a very high natural variability in microbiota composition between individual seeds and a low bacterial richness. In particular, our work on radish seeds showed a high variability in richness (1 to 46 bacterial taxa, Figure S1) and composition between individual seeds (Chesneau et al., 2022). An important finding was that seeds were generally dominated by one bacterial taxon (> 75% relative abundance) but its identity was highly variable between parental plants and even between seeds originating from the same plant.

Hence, studying the transmission of natural microbiota from seed to seedling and assessing their impacts on seedling phenotype is extremely challenging. Controlled conditions with the inoculation of known microbial assemblages are required to characterize the seed to seedling transmission and establish causal links between microbiota and seedling phenotypes.

The contribution of the plant microbiota to host nutrition or resistance to pathogens has been recently investigated through inoculation of synthetic microbial communities (SynComs) in the rhizosphere and the phyllosphere (e.g. Kwak et al., 2018; Carlström et al., 2019; Finkel et al., 2020). But so far, assembly and role of the plant microbiota in the early stage of the plant's life cycle has been neglected. One correlative study between seed microbiota structure and seed germination of different rapeseed genotypes offers promising results about the key role of microbiota in seed vigor (Rocheffort et al., 2019). One SynCom study by Figueiredo dos Santos et al., (2021) showed that seed disinfection reduced maize germination rates that could be recovered after inoculation of a SynCom on seeds. Additionally, Matsumoto et al., (2021) demonstrated the role of seed endophytes in disease resistance to the seed-borne pathogen *Burkholderia plantarii*. These reports encourage further investigations on the influence of seed microbiota on seedling microbiota assembly to uncover the role of this primary inoculum of plants.

In this context, we set up seed inoculation experiments under *in vitro* conditions to address the following objectives:

- Monitor the transmission of individual seed-borne bacteria and synthetic bacterial communities from seed to seedlings (here on radish plants) using *gyrB* amplicon sequencing
- Test the hypothesis that individual seed-borne bacteria and/or synthetic bacterial communities have significant effects on seedling phenotype

Twelve bacterial strains representative of radish seed microbiota were selected based on their abundance – prevalence in seeds without any *a priori* on their potential functions or effects on plants. The strains were studied either individually or in communities (mix of 6, 8, or 12 strains). In this study, we considered the entire seed and seedling microbiota, including both endophytes and bacteria living on the plant surfaces.

Material and methods

Seed material and bacterial strains

The radish seeds (*Raphanus sativus* var. Flamboyant5) used for bacterial strain isolation and the inoculation experiments were obtained from a field trial conducted in 2013 and 2014 at the experimental station of the National Federation of Seed Multipliers (FNAMS, 47°28'012.42"N - 0°23'44.30"W, Brain-sur-l'Authion, France).

A bacterial culture collection was obtained from a seed sample composed of approximately 1000 mature seeds (Torres-Cortés et al., 2019). Seed samples were soaked in 25 ml of phosphate-buffered saline (PBS, Sigma-Aldrich) with Tween® 20 (0.05 % v/v, Sigma-Aldrich) at 6°C under agitation (150 rpm) for 2h30. This seed soaking technique has been developed by the International Seed Testing Association for the detection of bacterial pathogens of Brassicaceae. This technique permits isolation and characterization of both the endophytic and epiphytic fractions of the radish seed microbiota (Chesneau et al., 2022). One hundred microliters of the suspension were plated on tryptic soy agar 1/10 strength (10% TSA) supplemented with cycloheximide (50 µg.ml⁻¹, Sigma-Aldrich, Saint-Louis, Missouri, USA). Plates were incubated at 20°C during a minimum 5 days. Isolated colonies were picked and grown on 10% TSA plates for 24-48 hours to obtain pure cultures. The taxonomy of the isolated strains was determined using Sanger sequencing of the *gyrB* gene. A total of 528 strains were obtained that represented the 4 main phyla (Proteobacteria, Bacteroidetes, Firmicutes, Actinobacteria) found in radish seeds, for a total of 11 assigned bacterial families and 17 genera.

To select strains representative of the radish seed bacterial community, we used the Seed Microbiota Database (Simonin et al., 2022) originating from a meta-analysis that gathers re-processed amplicon sequencing datasets from 50 plant species. All the radish seed datasets (*R. sativus* Flamboyant5) obtained with the *gyrB* marker gene (7 independent studies, n=295 seed samples) were extracted from the database. After filtering the ASVs with a low read number (<100 reads), the prevalence and relative abundance of ASVs (n=139) were calculated across all samples. The *gyrB* sequences of the ASVs were compared to the strains of our culture collection (Supplementary Data).

Seed inoculation experiment

Subsamples of seeds (1g ~100 seeds) were surface-sterilized using the following protocol: 1 min sonication (40 Hertz), soaking for 1 min in 96° ethanol, 5 min in 2.6% sodium hypochlorite, 30 sec in 96° ethanol and rinsed 3 times with sterile water. A subsample of 30 seeds was used to verify the efficacy of the surface-sterilization by soaking the seeds under agitation (150 rpm) for 2h30, plating on 10% TSA and incubating a minimum of 2 days at 20°C. The seeds were dried on sterile paper before the inoculation. Of note, the surface-sterilization cannot eliminate the seed endophytes without impairing seed physiology and germination potential. Endophyte diversity was therefore estimated in non-inoculated control seeds and seedlings.

Twelve bacterial strains of our culture collection conserved at the CIRM-CFBP were selected to build a simplified seed radish bacterial community (more details in the Result section, Figure 1). The strains were either inoculated alone on seeds or as SynComs of 6, 8, or 12 strains in sterile water. Subsamples of 30 seeds were dipped into bacterial suspensions (OD_{600nm} = 0.01, approximately 10⁷ CFU mL⁻¹) for 30 minutes under constant agitation (70 rpm) at 20°C. For the SynComs, each strain was added in equal proportion in the bacterial suspension to reach a final concentration of 10⁷ CFU mL⁻¹. Control seeds were inoculated with sterile water only. This concentration was selected based on previous seed inoculation experiments conducted in our team (Chesneau et al., 2022) and multiple reports of this concentration used in synthetic community inoculation on plants (e.g. Kwak et al., 2018; Pfeilmeier et al., 2021). The inoculated or control seeds were then placed individually at the surface of a sterile cotton pad moistened with 4 mL of sterile water in sterile glass tubes. A total of 30 seeds were sown by condition (control, single strains or SynComs, total of 16 conditions) that were incubated for 4 days in a growth chamber (photoperiod: 16h/8h, temperature 25/22°C).

The bacterial cell density of the inocula and inoculated seeds (pool of 30 seeds) were assessed by plating on 10% TSA (CFU mL⁻¹ or /seed) immediately after inoculating the seeds. In the SynCom experiment, an amplicon sequencing approach was used to measure the relative abundance of the different strains in the inocula, inoculated seeds and seedlings. Thus, 3 repetitions of 500 µL of the inocula and of the macerate

of inoculated seeds were stored at -80°C in a 96-well plate before DNA extraction and *gyrB* amplicon library preparation.

After 4 days of growth, the phenotypes of the seedlings were determined and then the seedlings were individually processed to assess bacterial cell density by plating and bacterial community composition by amplicon sequencing. The effects on seedling phenotypes were assessed using the protocol established by the International Seed Testing Association (<https://www.seedtest.org/en/handbooks-calibration-samples/seedling-evaluation-4th-edition-2018-product-1016.html>). Three types of phenotypes could be observed: non-germinated seeds, normal seedling or abnormal seedling. A seedling was considered abnormal if at least one of the cotyledons was necrotic or rotten, if the hypocotyl or epicotyl were deformed, or if the root system was absent, stunted or rotten.

To measure the bacterial cell density and the bacterial communities of seedlings, each entire plant (shoot and root together) without the remaining seed and tegument was crushed in a sterile plastic bag ($n=30$ seedlings by condition), resuspended in 2 mL of sterile water and homogenized. The seedling suspension was then serial-diluted and plated on 10% TSA to determine the CFU seedling⁻¹ and to assess the capacity of strains and SynComs to colonize seedlings. For graphical representations, we calculated the log values of bacterial population density for each sample separately and then calculated the descriptive statistics of each condition to represent them as box plots. The remaining seedling suspensions were stored at -80°C in a 96-well plate before DNA extraction and library preparation for the *gyrB* gene amplicon sequencing.

Amplicon sequencing of seed and seedling bacterial communities

DNA extraction was performed on the inocula, inoculated seeds and seedlings of the SynCom conditions (control, 6-strain, 8-strain, 12-strain SynComs) with the NucleoSpin® 96 Food kit (Macherey-Nagel, Düren, Germany) following the manufacturer's instructions.

The first PCR was performed with the primers *gyrB_aF64/gyrB_aR553* (Barret et al., 2015), which target a portion of *gyrB* gene in bacteria. PCR reactions were performed with a high-fidelity Taq DNA polymerase (AccuPrime™ Taq DNA Polymerase High Fidelity, Invitrogen, Carlsbad, California, USA) using 5 μL of 10X Buffer, 1 μL of forward and reverse primers (100 μM), 0.2 μL of Taq and 5 μL of DNA. PCR cycling conditions constituted an initial denaturation step at 94°C for 3 min, followed by 35 cycles of amplification at 94°C (30 s), 55°C (45 s) and 68°C (90 s), and a final elongation at 68°C for 10 min. Amplicons were purified with magnetic beads (Sera-Mag™, Merck, Kenilworth, New Jersey). The second PCR was conducted to incorporate Illumina adapters and barcodes. The PCR cycling conditions were: denaturation at 94°C (1 min), 12 cycles at 94°C (1 min), 55°C (1 min) and 68°C (1 min), and a final elongation at 68°C for 10 min. Amplicons were purified with magnetic beads and pooled. Concentration of the pool was measured with quantitative PCR (KAPA Library Quantification Kit, Roche, Basel, Switzerland). Amplicon libraries were mixed with 5% PhiX and sequenced with MiSeq reagent kits v2 500 cycles (Illumina, San Diego, California, USA). A blank extraction kit control, a PCR-negative control and PCR-positive control (*Lactococcus piscium*, a fish pathogen that is not plant-associated) were included in each PCR plate. The raw amplicon sequencing data are available on the European Nucleotide Archive (ENA) with the accession number PRJEB58635.

The bioinformatic processing of the amplicons was performed in R. In brief, primer sequences were removed with cutadapt 2.7 (Martin, 2011) and trimmed fastq files were processed with DADA2 version 1.10 (Callahan et al., 2016). Chimeric sequences were identified and removed with the removeBimeraDenovo function of DADA2. Amplicon Sequence Variant (ASV) taxonomic affiliations were performed with a naive Bayesian classifier (Wang et al., 2007) with our in-house *gyrB* database (train_set_gyrB_v4.fa.gz) available upon request. Unassigned sequences at the phylum level and *parE* sequences (a *gyrB* paralog) were filtered. The identification of sequence contaminants was assessed using decontam version 1.8.0 based on our negative controls. After these filtering steps, samples with less than 1000 reads were excluded from the study. The index hopping rate was assessed using our positive controls and the values for this sequencing run were $< 0.01\%$ as expected for the Illumina platform.

Statistics and microbial community analyses

All the scripts and datasets used to conduct the study are available on GitHub (https://github.com/marie-simonin/Radish_SynCom). We assessed the effect of the inoculation and sample type on the various univariate variables (e.g. seedling bacterial cell density, strain relative

abundance, ASV richness) using generalized mixed models (*glm* function in lme4 package) and post hoc comparisons were performed using the Tukey method (*warp.emm* function in package *emmeans*). The statistical tests performed to compare the number of normal and abnormal seedling phenotypes between control and inoculated seeds (single strain or SynCom) was done using a Fisher exact test for count data.

The analyses on bacterial community structure based on the amplicon sequencing data were done after rarefaction at 14116 reads per sample to conserve sufficient replicates while having a good sampling depth. Diversity and community structure analyses were performed in R 3.6.2 using the *phyloseq* (v1.28.0), *vegan* (v2.5-7) and *microbiome* (v1.7.21) packages (Oksanen et al., 2007; McMurdie & Holmes, 2013; Lahti et al., 2017). The diversity of the inocula, inoculated seeds and seedlings was characterized using ASV richness. The effects of inoculation and sample types on bacterial community structure were assessed using Bray-Curtis dissimilarity associated with a permutational multivariate analysis of variance (*adonis* and *pairwise.adonis* functions, 999 permutations). Non-Metric Multidimensional Scaling (NMDS) were used to plot the ordinations. The influence of the inoculation of community beta-dispersion was assessed using the *betadisper* function in *vegan* based on Bray-Curtis distance matrix and distance to centroid to each condition. The statistical effects were evaluated using a permutation-based test of multivariate homogeneity of group dispersions followed by a Tukey's honest significant differences test.

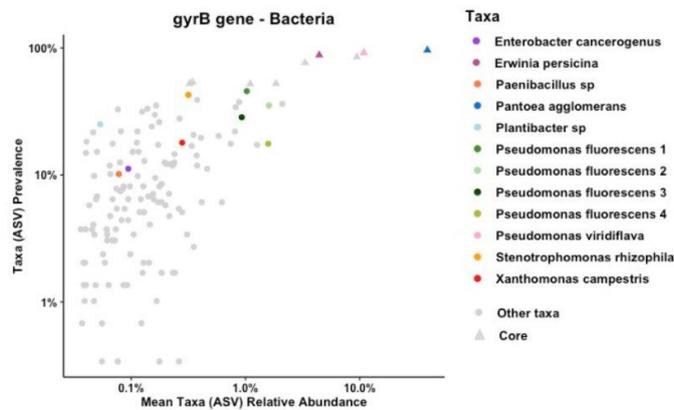
All figures were prepared using the *ggplot2* (v3.3.3) package and the data management was done using the *dplyr* (v1.0.4) and *tidyverse* (v1.3.0) packages in R.

Results

Bacterial strain selection based on a meta-analysis of radish seed microbiota

A bacterial culture collection isolated from radish seeds composed of 528 strains was obtained. The strains represented the 4 main phyla (Proteobacteria, Bacteroidetes, Firmicutes, Actinobacteria) found in radish seeds, for a total of 11 assigned bacterial families and 17 genera. For this study, we have selected 12 bacterial strains representatives of the diversity and prevalence-abundance profiles of radish seed microbiota (Figure 1A). These strains were selected without any *a priori* on their potential functions or effects on plant phenotype since seed bacterial communities include a diversity of plant-pathogens, commensals and mutualistic taxa (e.g. Simonin et al. 2022). The selection included three (out of nine) extremely abundant and prevalent taxa (i.e core taxa, prevalence >80%, Figure 1A and 1B), but also five sub-dominant (relative abundance < 1.5% and prevalence < 20%) and four rare taxa (prevalence < 20%). Ten strains belonged to Gammaproteobacteria (Enterobacteriaceae, Erwiniaceae, Pseudomonadaceae, Xanthomonadaceae) and the two remaining strains were from the Actinobacteria and Bacilli classes (Figure 1B). In addition to selecting strains that were phylogenetically diverse, we also included infra-species diversity with four strains of the *Pseudomonas fluorescens* subgroup (Hesse et al., 2018) with contrasted prevalence and abundance profiles. Indeed, 380 ASVs affiliated to *Pseudomonas* (25% of the total bacterial richness and 33% of the bacterial relative abundance) were previously detected in the seven radish datasets used in the meta-analysis (Simonin et al. 2022). Among this genus, the most diverse species group was *Pseudomonas fluorescens* with 62 ASVs that justified its selection to study interactions between closely related species. The twelve strains selected presented different *gyrB* gene sequences (subspecies level detection) to enable their individual tracking using *gyrB* amplicon sequencing. The *gyrB* sequences of the selected strains and of all bacteria detected in the study (seeds and seedlings) are available in Supplementary Data. The strains were studied in isolation and in SynComs of 6, 8 and 12 strains (Figure 1B) to match the bacterial diversity observed on individual radish seeds (median = 8 ASVs; Figure S1; Chesneau et al. 2022). We performed a nested design for the three diversity levels, with the 6-strain SynCom composed of two high prevalence strains, two intermediate and two low prevalence strains. The 8-strain and 12-strain SynComs were built on this initial community with an increasing number of high-, intermediate- and low-prevalence strains.

A. Prevalence-Abundance of selected taxa in radish seed microbiota



B. Identity of selected strains for SynCom experiments

Strain	Class	Species	Type	Prevalence	Relative Abundance	SynCom 6 strains	SynCom 8 strains	SynCom 12 strains
CFBP13505	Gammaproteobacteria	Pantoea agglomerans	Core	96.3%	39.04%	●	●	●
CFBP13507	Gammaproteobacteria	Pseudomonas viridiflava	Core	91.9%	10.86%	●	●	●
CFBP13511	Gammaproteobacteria	Erwinia persicina	Core	88.1%	4.42%	●	●	●
CFBP13509	Gammaproteobacteria	Pseudomonas fluorescens subgroup 1		45.8%	1.03%	●	●	●
CFBP13503	Gammaproteobacteria	Stenotrophomonas rhizophila		42.7%	0.32%	●	●	●
CFBP13528	Gammaproteobacteria	Pseudomonas fluorescens subgroup 2		35.3%	1.60%	●	●	●
CFBP13506	Gammaproteobacteria	Pseudomonas fluorescens subgroup 3		28.5%	0.93%	●	●	●
CFBP13513	Actinobacteria	Plantibacter sp		25.1%	0.05%	●	●	●
CFBP6650	Gammaproteobacteria	Xanthomonas campestris		18.0%	0.28%	●	●	●
CFBP13502	Gammaproteobacteria	Pseudomonas fluorescens subgroup 4		17.6%	1.58%	●	●	●
CFBP13530	Gammaproteobacteria	Enterobacter cancerogenus		11.2%	0.09%	●	●	●
CFBP13512	Bacilli	Paenibacillus sp		10.2%	0.08%	●	●	●

Figure 1: Selection of bacterial strains representative of the radish seed microbiota. A. Prevalence and relative abundance of bacterial ASVs (*gyrB* amplicon sequencing) in radish seed microbiota (*R. sativus* Flamboyant5) from seven independent studies. The colored points represent the taxa selected in this study and the triangle shapes represent the taxa identified as members of the radish core seed microbiota. B. Identity of the strains isolated from radish seeds and used in the SynCom experiments.

Transmission of single strains and synthetic communities from seed to seedling

Bacterial colonization of seedlings by all strains and SynComs

Transmission of the twelve individual strains and the three SynComs to radish seedlings was first assessed. When individual strains were seed-inoculated, they were all successfully transmitted to seedlings with a median of 6.8 log CFU seedling⁻¹. The seedlings originating from seeds inoculated with SynComs were colonized at similar levels of bacterial cell density (median = 7.4 log CFU seedling⁻¹). Single strains and SynComs all reached around 7 log CFU seedling⁻¹ that appear to be the bacterial carrying capacity of a radish seedling in our system. The bacterial densities on the control seedlings that originated from surface-sterilized seeds were below detection limit or close to 2 log CFU seedling⁻¹, validating that the bacterial populations observed on seedlings in the different conditions originated from our inocula.

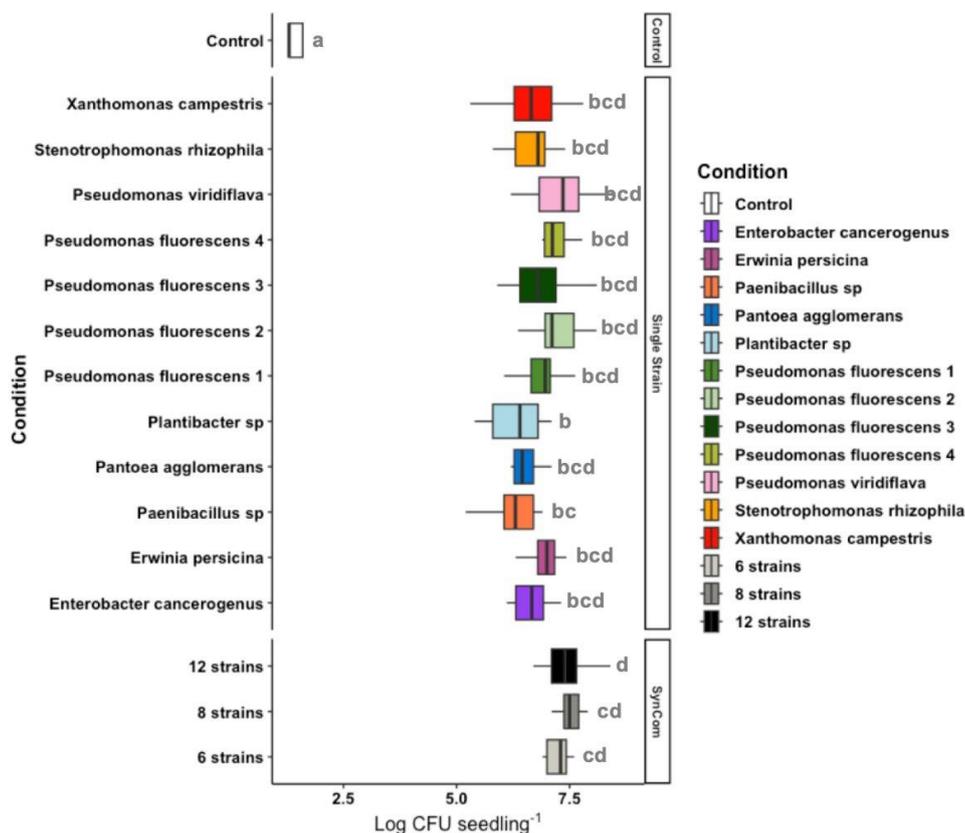


Figure 2: High seedling bacterial colonization (bacterial population densities > Log 7 CFU seedling⁻¹) in the different inoculation treatments (n=30 seedlings per condition). CFU: Colony Forming Unit. The different letters represent the results of a post-hoc Tukey HSD test.

Bacterial community structure of seeds and seedlings inoculated with SynComs

The next step was to assess our ability to manipulate the seed and seedling bacterial community using SynCom inoculation compared to non-inoculated control seeds. Using *gyrB* gene amplicon sequencing, it was validated that the SynCom inoculation led to a significant modification of seed and seedling bacterial community compared to the control condition (pairwise adonis: $P < 0.007$; Figure 3A). On the NMDS ordination, the three sample types (inoculum, seed and seedling) clustered closely by SynCom indicating a high degree of similarity, whereas the control seeds and seedlings were very dispersed. This observation was further confirmed by a beta-dispersion analysis (distance to centroid) indicating that the SynCom inoculation strongly reduced the variability in seed and seedling community structure compared to the control condition (Figure 3B, 3C). Furthermore, it was confirmed that the three SynComs were significantly distinct in the three types of samples (inocula, seeds, seedlings, Figure 3D), with an expected structuration showing the 6 and 12-strain SynComs as the most different and the 8-strain SynCom with an intermediate composition.

Effect of SynCom inoculation on seed and seedling richness

Next, the effect of SynCom inoculation on the bacterial richness of seeds and seedlings was assessed. It was confirmed that SynCom inoculation enabled the reconstruction of a diversity gradient on both seeds and seedlings (Figure 4A). The bacterial richness measured on seeds and seedlings corresponded to the expected taxa richness present in the inocula (6, 8 or 12 ASVs). The control seeds were surface-disinfected but they still harbored a low bacterial diversity likely to be endophytic bacteria, including ASVs of strains included in the SynComs because the strains selected have been isolated from the same radish genotype.

The microbiota comparison of native and surface-disinfected seeds suggests that seed endophytes still present after disinfection are dominated by *Pseudomonas* species and *Pantoea agglomerans* (Figure S2). Altogether, these results show the efficacy of the SynCom inoculation on seeds to drive the bacterial diversity of both seeds and seedlings.

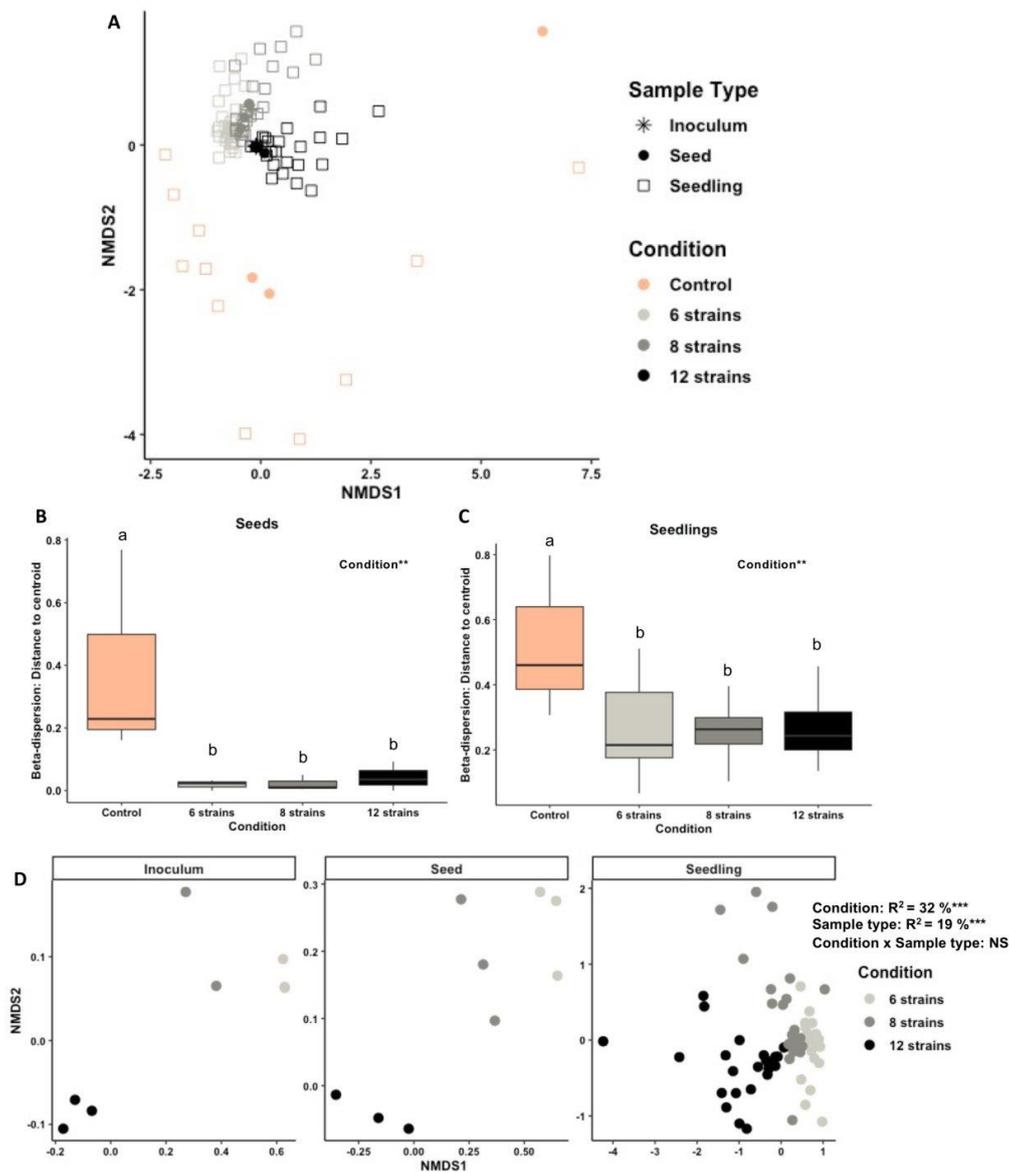


Figure 3: Impact of SynCom inoculation on seed and seedling bacterial community structure. A) Bacterial community structure for the three sample types and inoculation treatments visualized through an NMDS ordination based on Bray-Curtis distances (stress = 0.155). Beta-dispersion assessed using distance to centroid of the B) seed and C) seedling community structure. D) Bacterial community structure of the three SynComs in the inocula, seeds and seedlings visualized through an NMDS ordination based on Bray-Curtis distances (stress = 0.165). The asterisks represent the significance of the Permanova test: $^{***}P < 0.001$, NS=Non-Significant. The different letters represent the results of a post-hoc Tukey HSD test; two conditions with no letters in common are statistically different.

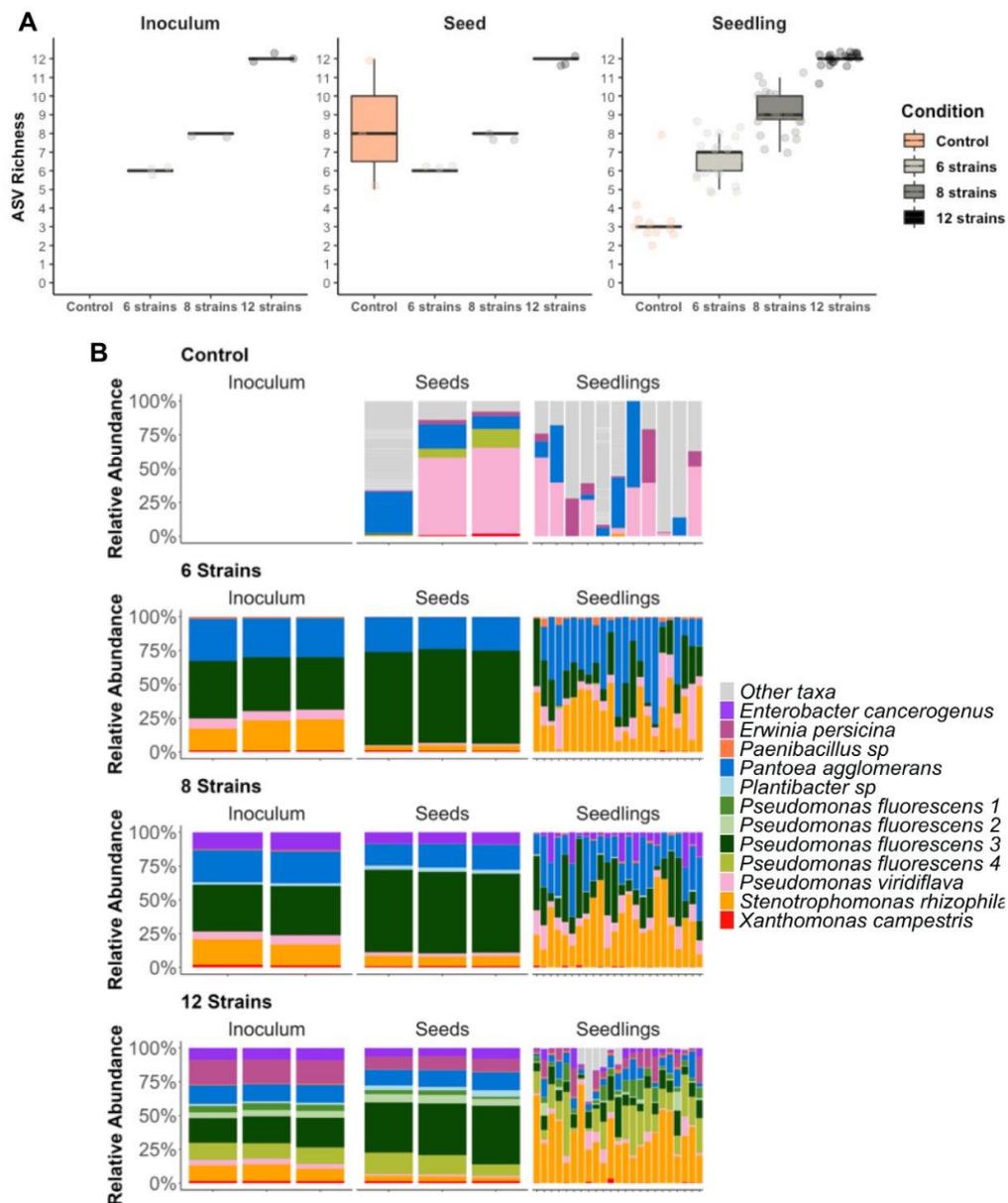


Figure 4: Shifts in bacterial diversity and composition of seeds and seedlings inoculated with SynComs A) Bacterial taxa richness (ASV richness) of the inocula, inoculated seeds and seedlings in the different conditions. B) Taxonomic profile of the inoculum, seeds and seedlings in the four different conditions (control, 6 strains, 8 strains and 12 strains). Each stacked bar represents a sample. The composition of the “other taxa” in control seeds and seedlings are presented in Figure S2 and S3, respectively.

Tracking of the transmission of the SynCom strains between the inoculum, seeds and seedlings

Based on the unique *gyrB* ASV of the 12 strains, we were able to track their transmission patterns from the inoculum to the seedling. First, we characterized the natural abundance of the strain ASVs in the control seeds and seedlings. The 12 ASVs were naturally found in control seeds and seedlings, especially the ASVs associated with the *Pseudomonas viridiflava*, *Pantoea agglomerans*, *Pseudomonas fluorescens* 4 and

Erwinia persicina strains (Figure 4B). A complete taxonomic description of the control seedlings (including the “other taxa”) is available in Figure S3. It shows that control seedling bacterial community is highly variable between individuals and is generally dominated by 2 to 9 ASVs. As already seen in Figure 3A, the SynCom inoculations led to completely different seed and seedling bacterial community compositions than in the control condition (Figure 4B). Interestingly, we observed some differences in the abundance of strains between the inoculum and the seed community profile (Figure 5A), indicating differences between strains for their capacity to colonize the seed during inoculation (Figure 5B). For instance, the strain *Pseudomonas fluorescens* 3 had a higher relative abundance on seeds (40-70%) compared to the inocula (20-40%), while the strains *Pseudomonas viridiflava* and *Stenotrophomonas rhizophila* had the opposite pattern (Figure 5B).

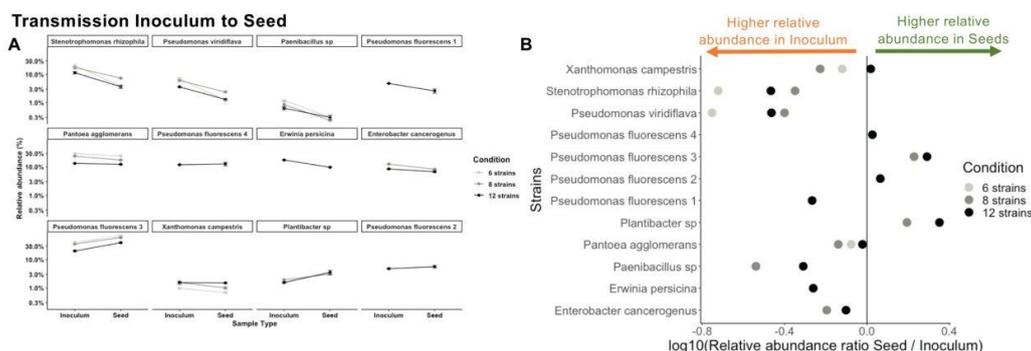


Figure 5: Contrasted capacities of strains in seed colonization A. Relative abundance patterns of each strain during the transmission from inoculum to seed (A) in synthetic bacterial communities. B. Ability of each strain to colonize seeds compared to their initial relative abundance in the inocula: ratio of relative abundance seed / inoculum.

During the phenological transition from seed to seedling, we observed an important restructuring of the bacterial community (Figure 4B). All the strains were able to transmit from seeds to seedlings but with variable success depending on the SynCom richness and the seedling individual (Figure 4B, 6). Across the three SynComs, *Stenotrophomonas rhizophila* was the most successful seedling colonizer (mean relative abundance = 30 to 36%), followed by *Pantoea agglomerans* but only in the 6- and 8-strain SynComs (mean relative abundance = 34 and 25%). In contrast, the strain *Pseudomonas fluorescens* 3 that was dominant on seeds strongly decreased in abundance on seedlings (11 to 24%).

The fate of each strain was monitored during the seed to seedling transmission across the three SynComs and we grouped the strains in three categories: increasers, stable, decrease (Figure 6A). Four 'increaser' strains were identified and three of them presented this positive transmission pattern across the three SynComs (*Stenotrophomonas rhizophila*, *Pseudomonas viridiflava*, *Paenibacillus sp.*). In contrast, four 'decrease' strains were identified with three of them with a consistent negative transmission pattern (*Pseudomonas fluorescens* 3, *Xanthomonas campestris*, *Plantibacter sp.*). Finally, four strains presented a stable transmission or a variable profile depending on the inoculated SynCom. For instance, *Pantoea agglomerans* and *Enterobacter cancerogenus* had a stable transmission in the 6- or 8-strain SynComs, but decreased in the 12-strain SynCom. Interestingly, the 4 strains of *Pseudomonas fluorescens* tested presented contrasted transmission patterns or abundance profiles and were found in the three categories (increaser, stable or decrease). Another interesting result was that the four strains identified as "increasers" were not the best seed colonizers after inoculation (Figure 5A, 5B). Inversely, some of the best seed colonizers (*Pseudomonas fluorescens* 3) were identified as "decrease" on seedlings, indicating contrasted strain fitness depending on the plant phenological stage.

We also analyzed the influence of the SynCom composition on the ability of each strain to colonize seedlings compared to their initial relative abundance on seeds (i.e ratio of relative abundance seedling / seed, Figure 6B). We observed that the SynCom richness strongly influenced the abundance patterns of the strains. Most strains had a lower seedling colonization in the 12-strain SynCom (e.g. *Pantoea*

agglomerans, *Enterobacter cancerogenus*), with the exception of *Stenotrophomonas rhizophila* (Figure 6B). Some strains had a higher seedling colonization in the 6-strain SynCom than the 8-strain SynCom (*Pseudomonas viridiflava*, *Paenibacillus sp*, *Stenotrophomonas rhizophila*). Altogether, these results indicate strong fitness differences between strains in the seed and seedling habitat, that is highly dependent on the surrounding community.

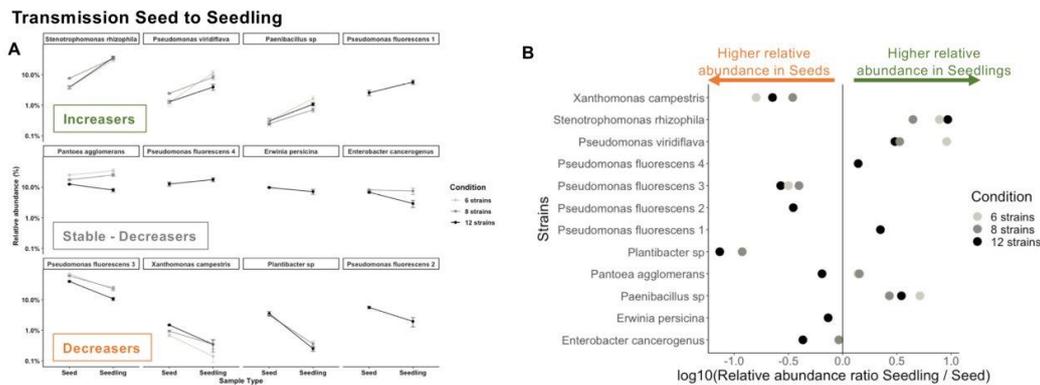


Figure 6: Contrasted capacities of strains in seedling colonization. A. Relative abundance patterns of each strain during the transmission from seed to seedling. B. Ability of each strain to colonize seedlings compared to their initial relative abundance on seeds: ratio of relative abundance seedling / seed.

Effect of single bacterial strains or synthetic communities on seedling phenotype

Identification of strains and SynComs increasing the proportion of abnormal seedlings and non-germinated seeds

The impact of the inoculation of single strains or SynComs on seedling phenotypes was assessed based on the proportion of non-germinated seeds, normal and abnormal seedlings observed (Figure 7). In the control condition, we observed a low proportion of non-germinated (7%) and abnormal seedlings (7%). Several individual strains and the three SynComs caused detrimental effects on seedling phenotypes. In particular, *Pseudomonas viridiflava*, *Paenibacillus sp* and two of the SynComs (6 and 8 strains) had significantly larger proportions of abnormal seedlings (60 to 73%). The 12-strain SynCom also led to an increased proportion of abnormal seedlings (34%), but to a lesser extent than the other two SynComs. The conditions that presented the highest proportion of normal seedlings were *Stenotrophomonas rhizophila* (90%), *Pseudomonas fluorescens 3* (90%) and *Plantibacter sp* (87%).

Modifications in the composition of seedling microbiota between normal and abnormal seedlings

Next, we analyzed if the seedling bacterial community structure was different depending on the seedling phenotype (Figure 8A). The seedling phenotype was a significant driver of seedling microbiota ($R^2=3.7\%$), especially in the 12-strain SynCom (interaction Condition \times Phenotype, $P=0.006$), for which the number of normal and abnormal seedlings was more balanced (14 normal vs 10 abnormal). In the 12-strain SynCom, we analyzed if some strains had a significantly higher or lower relative abundance in abnormal seedlings (Figure 8B). The strains *Enterobacter cancerogenus* and *Erwinia persicina* were more abundant in abnormal seedlings, while *Pseudomonas viridiflava* and *Xanthomonas campestris* were less abundant.

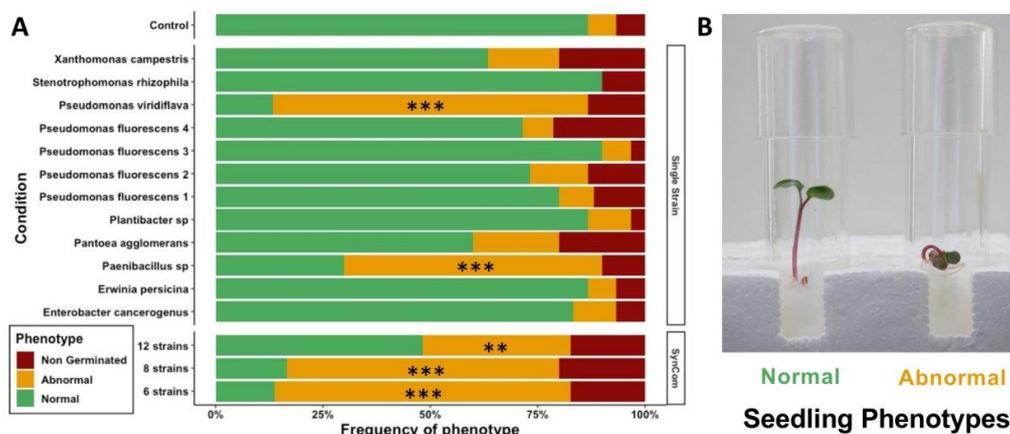


Figure 7: A) Effect of the inoculation of single bacterial strains or synthetic bacterial community on germination and seedling phenotypes. The asterisks represent the significance of the Fisher exact test that compares the proportions of normal and abnormal seedling phenotypes between control and inoculated seeds: *** $P < 0.001$, ** $P < 0.01$. B) Image of the typical phenotypes observed in the experiment (Credit: Guillaume Chesneau).

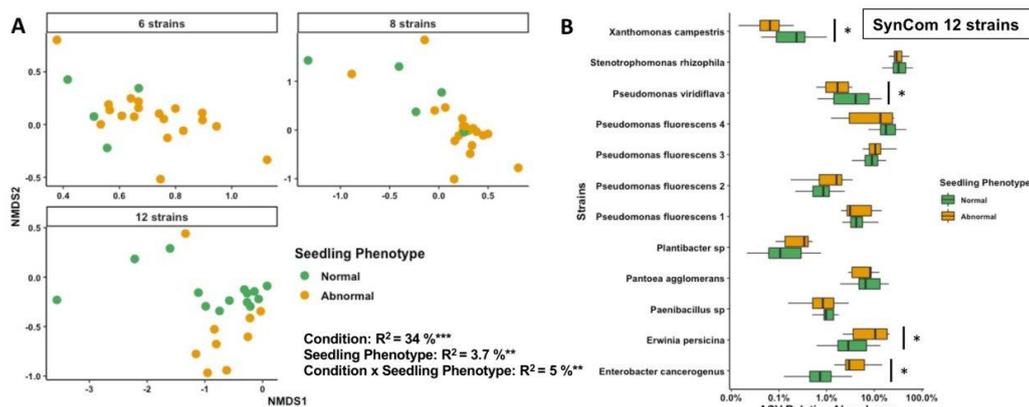


Figure 8: Influence of seedling phenotype (normal or abnormal) on A) bacterial community structure (stress=0.17) and B) on the strain relative abundance on the 12-strain SynCom. The asterisks represent the significance of the Permanova test or post-hoc Tukey test: * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$.

Discussion

Community- and strain-specific patterns of seedling transmission of seed-borne bacteria

This study demonstrates that a precise manipulation of the seed and seedling bacterial community is possible through SynCom inoculations. The main achievements of this experiment rely on the successful reconstruction of a richness gradient (6, 8 and 12 strains) on both seeds and seedlings and on the strong reduction in the natural variability of microbiota structure (beta-dispersion). SynCom inoculation leads to more homogeneous microbial community compositions between replicates compared to native communities described in Figure S2 or in previous reports from the literature (Moroenyane et al., 2021; Walsh et al., 2021). This homogenization of community structure is due to the high abundance of inoculated strains (10^7 CFU seedling⁻¹), which makes the members of the native endophytic community (10^2 CFU seedling⁻¹) undetectable. This similarity of seed microbiota between seed replicates is a

prerequisite to study the transmission of microorganisms from seed to seedling and establish causal relationship between seed microbiota and plant microbiota or phenotype.

The inoculation of the three different SynComs on seeds led to the assembly of significantly distinct seedling bacterial communities. However, the relative abundance of the strains changed drastically from the inocula to seeds and then to seedlings. Some strains like *Pseudomonas fluorescens* 3 were excellent seed colonizers, while others had a reduced abundance compared to the inocula (e.g. *S. rhizophila*). These differences in seed colonization can be due to contrasted adhesion capacity of strains related to the secretion of large adhesins (i.e. LapA, LapF) and the presence of flagella (DeFlaun et al., 1994; Yousef-Coronado et al., 2008; Duque et al., 2013).

Interestingly, the best seed colonizers were not the best seedling colonizers. In contrast, all the strains that declined during the inocula-seed transition phase increased in the seed-seedling transition (i.e. "increasers"). In particular, *S. rhizophila* became dominant on seedlings of the three SynComs. These results indicate that the bacterial traits required to colonize seeds and seedlings are different. Previous studies indeed indicate that seed colonization is associated with high tolerance to desiccation and chemotaxis-induced motility (Truyens et al., 2015), while successful seedling colonization is linked to copiotrophic lifestyles with fast growth in response to increased nutrient availability (Barret et al., 2015; Torres-Cortés et al., 2018). Moreover, these findings suggest that being dominant on seeds does not provide an advantage to become dominant on seedlings. These findings are in line with Rochefort et al., (2021) and Chesneau et al., (2022) demonstrating a low transmission success of abundant seed taxa to seedlings in natural microbial communities.

Additionally, we observed that SynCom richness influenced the seedling transmission of the strains, indicating an important role of biotic interactions in seedling microbiota assembly. For instance, *Pantoea agglomerans* had a positive seedling colonization success in the 6- and 8-strain SynComs and a negative one in the 12-strain SynCom. These SynCom-specific patterns of each strain are likely driven by exploitative and interference competition between individuals that necessitate subsequent drop-out SynCom experiments to identify the specific mechanisms expressed *in planta* (Hibbing et al., 2010; Granato et al., 2019).

Our experiments included four different strains of *Pseudomonas fluorescens* to compare the intra-specific patterns of seedling transmission. Both seed and seedling colonization patterns were highly strain-specific. We observed all possible outcomes depending on the *Pseudomonas fluorescens* strain considered (increasers, stable or decreaseers). This observation is in line with another study on diverse *Pseudomonas fluorescens* strains that greatly varied in their ability to colonize *Arabidopsis thaliana* alone or in competition with another *Pseudomonas sp.* strain (Wang et al., 2022). This result suggests important differences between strains in traits involved in habitat colonization and competitive interactions, that prevent any generalization of these observations at the species level.

Altogether, these results show that SynCom inoculation can effectively manipulate seed and seedling microbiota diversity and highlight strong fitness differences between native seed-borne taxa in the colonization of these habitats.

Contrasting effects of seed-borne bacteria on seedling phenotype in isolation and in a community context

This study demonstrates the value to study plant phenotype modulation by bacteria in a community setting using SynComs. The proportion of abnormal seedling phenotypes decreased at the highest SynCom richness level (12 strains). This observation could be explained by a "dilution" of the negative effects of the detrimental strains as the diversity increased and their relative abundances decreased. Still surprisingly, the strains enriched in abnormal seedlings in the 12-strain SynCom had not been identified as detrimental in isolation (*Enterobacter cancerogenus* and *Erwinia persicina*). Furthermore, we found that the detrimental *Pseudomonas viridiflava* and the seed-borne pathogen *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* were even reduced in abundance in abnormal seedlings in this condition. We can propose different hypotheses to explain these results. One is that the identity of the strains responsible for the abnormal phenotypes are different when inoculated in a community (*Enterobacter cancerogenus* and *Erwinia persicina*) or in isolation (*Pseudomonas viridiflava* and *Paenibacillus sp.*). Another hypothesis is that *Enterobacter cancerogenus* and *Erwinia persicina* are opportunistic taxa that are enriched in abnormal seedlings (e.g. necrotrophy or "cry for help" of the plant) but are not responsible for the altered phenotype.

Previous reports on diseased plants caused by a known pathogen support these hypotheses as the increase in abundance of beneficial protective strains or opportunistic copiotrophic taxa is frequently observed (Masson et al., 2020; Pfeilmeier et al., 2021; Arnault et al., 2023).

In isolation *Pseudomonas viridiflava* and *Paenibacillus* sp strongly increased the proportion of abnormal seedlings. *Pseudomonas viridiflava* is a very common plant-associated bacterium with various life-styles (endophytes, epiphytes, saprotrophs, pathogens) reported to be extremely prevalent in seeds (Simonin et al., 2022) and in the phyllosphere of a large diversity of hosts (Karasov et al., 2018; Lipps & Samac, 2022; Lundberg et al., 2022). *Pseudomonas viridiflava* is frequently seed-transmitted and can cause germination arrest or symptoms on seedlings, including in radish (Shakya & Vinther, 1989; Samad et al., 2017). *Paenibacillus* strains are mainly recognized for their biocontrol capacities against various bacterial or fungal pathogens (Ryu et al., 2006; Ling et al., 2011), but one report indicates root damages caused by this bacteria under gnotobiotic conditions like in our study (Rybakova et al., 2016). Another important observation was that the three bacterial strains identified as seed core taxa (*Pseudomonas viridiflava*, *Pantoea agglomerans*, *Erwinia persicina*) were associated with detrimental effects on seedling phenotypes either in isolation or in SynComs. These results are in line with other studies showing that the plant core microbiota includes pathogens or conditional pathogens that have a pathogenic potential but are generally kept in check by other members of the microbiota and the host (Simonin et al., 2020; Pfeilmeier et al., 2021).

Additionally, we show that the inoculation of multiple strains with potential pathogenic effects (i.e pathobiome) do not have additive effects that could have led to an absence of germination or 100% of abnormal seedlings. The reduction of detrimental effects in the 12-strain SynCom experimentally confirms the importance of bacterial interactions in plant disease development in a pathobiome context (Bass et al., 2019). This observation is supported by other SynCom experiments on the phyllosphere demonstrating the role of single or consortia of commensal microorganisms (e.g *Pseudomonas*) in disease protection (Vogel et al., 2021; Shalev et al., 2022). Increasing microbial interactions with higher SynCom diversity is a promising leverage for reducing the impact of deleterious bacterial strains.

Altogether, these results indicate that this synthetic ecology approach is valuable to better understand the assembly of plant microbiota in early life stages and the context dependency of disease expression in a community setting. This approach permitted identifying several seed core bacteria with detrimental effects on germination and seedlings but also to characterize the transmission success of diverse bacterial strains (i.e increasers, stable, decreasers) to seedlings in three community contexts.

Acknowledgements

The authors are grateful to Guillaume Chesneau, Gloria Torres-Cortes and Samir Rezki that produced several radish seed microbiota datasets used in the meta-analysis performed. We thank Emmanuelle Laurent and Vincent Odeau (FNAMS) for field crop management and the production of the initial seed samples used in this study. We thank Muriel Bahut (ANAN platform, SFR QuaSav) for amplicon sequencing. We also thank the International Centre of Microbial Resource (CIRM) - French Collection for Plant-associated Bacteria (CFBP – INRAE, <https://doi.org/10.15454/E8XX-4Z18>) for the conservation of the bacterial strains of the study. Preprint version 3 of this article has been peer-reviewed and recommended by Peer Community In Microbiology (Massart, 2023, <https://doi.org/10.24072/pci.microbiol.100008>).

Funding

This work was supported by the French National Research Agency [ANR-17-CE20-0009-01].

Conflict of interest disclosure

The authors declare that they comply with the PCI rule of having no financial conflicts of interest in relation to the content of the article.

Data, scripts, code, and supplementary information availability

The raw amplicon sequencing data are available on the European Nucleotide Archive (ENA) with the accession number PRJEB58635.

All the scripts (bioinformatics, analyses, figures) and datasets used to conduct the study are available here: <https://doi.org/10.5281/zenodo.8403589> (Simonin 2023).

References

- Arnault G, Mony C, Vandenkoornhuysen P (2023) Plant microbiota dysbiosis and the Anna Karenina Principle. *Trends in Plant Science*, 28, 18–30. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2022.08.012>
- Barret M, Briand M, Bonneau S, Prévieux A, Valière S, Bouchez O, Hunault G, Simoneau P, Jacques M-A (2015) Emergence Shapes the Structure of the Seed Microbiota. *Applied and Environmental Microbiology*, 81, 1257–1266. <https://doi.org/10.1128/AEM.03722-14>
- Bass D, Stentiford GD, Wang H-C, Koskella B, Tyler CR (2019) The Pathobiome in Animal and Plant Diseases. *Trends in Ecology & Evolution*, 34, 996–1008. <https://doi.org/10.1016/j.tree.2019.07.012>
- Bintarti AF, Sulesky-Grieb A, Stopnisek N, Shade A (2022) Endophytic Microbiome Variation Among Single Plant Seeds. *Phytobiomes Journal*, 6, 45–55. <https://doi.org/10.1094/PBIOMES-04-21-0030-R>
- Callahan BJ, McMurdie PJ, Rosen MJ, Han AW, Johnson AJA, Holmes SP (2016) DADA2: High-resolution sample inference from Illumina amplicon data. *Nature Methods*, 13, 581–583. <https://doi.org/10.1038/nmeth.3869>
- Carlström CI, Field CM, Bortfeld-Miller M, Müller B, Sunagawa S, Vorholt JA (2019) Synthetic microbiota reveal priority effects and keystone strains in the Arabidopsis phyllosphere. *Nature Ecology & Evolution*, 3, 1445–1454. <https://doi.org/10.1038/s41559-019-0994-z>
- Chesneau G, Laroche B, Prévieux A, Marais C, Briand M, Marolleau B, Simonin M, Barret M (2022) Single Seed Microbiota: Assembly and Transmission from Parent Plant to Seedling. *mBio*, 13, e01648-22. <https://doi.org/10.1128/mbio.01648-22>
- Chesneau G, Torres-Cortes G, Briand M, Darrasse A, Prévieux A, Marais C, Jacques M-A, Shade A, Barret M (2020) Temporal dynamics of bacterial communities during seed development and maturation. *FEMS Microbiology Ecology*, 96. <https://doi.org/10.1093/femsec/fiaa190>
- DeFlaun MF, Marshall BM, Kulle E-P, Levy SB (1994) Tn 5 insertion mutants of *Pseudomonas fluorescens* defective in adhesion to soil and seeds. *Applied and Environmental Microbiology*, 60, 2637–2642. <https://doi.org/10.1128/aem.60.7.2637-2642.1994>
- Duque E, de la Torre J, Bernal P, Molina-Henares MA, Alaminos M, Espinosa-Urgel M, Roca A, Fernández M, de Bentzmann S, Ramos J-L (2013) Identification of reciprocal adhesion genes in pathogenic and non-pathogenic *Pseudomonas*. *Environmental Microbiology*, 15, 36–48. <https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2012.02732.x>
- Figueiredo dos Santos L, Fernandes Souta J, de Paula Soares C, Oliveira da Rocha L, Luiza Carvalho Santos M, Grativol C, Fernando Wurdig Roesch L, Lopes Olivares F (2021) Insights into the structure and role of seed-borne bacteriome during maize germination. *FEMS Microbiology Ecology*, 97, fiab024. <https://doi.org/10.1093/femsec/fiab024>
- Finkel OM, Salas-González I, Castrillo G, Conway JM, Law TF, Teixeira PJL, Wilson ED, Fitzpatrick CR, Jones CD, Dangl JL (2020) A single bacterial genus maintains root growth in a complex microbiome. *Nature*, 587, 103–108. <https://doi.org/10.1038/s41586-020-2778-7>
- Granato ET, Meiller-Legrand TA, Foster KR (2019) The Evolution and Ecology of Bacterial Warfare. *Current Biology*, 29, R521–R537. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2019.04.024>
- Hibbing ME, Fuqua C, Parsek MR, Peterson SB (2010) Bacterial competition: surviving and thriving in the microbial jungle. *Nature Reviews Microbiology*, 8, 15–25. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2259>
- Karasov TL, Almario J, Friedemann C, Ding W, Giolai M, Heavens D, Kersten S, Lundberg DS, Neumann M, Regalado J (2018) Arabidopsis thaliana and Pseudomonas pathogens exhibit stable associations over evolutionary timescales. *Cell host & microbe*, 24, 168–179. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2018.06.011>

- Kumar M, Kour D, Yadav AN, Saxena R, Rai PK, Jyoti A, Tomar RS (2019) Biodiversity of methylophilic microbial communities and their potential role in mitigation of abiotic stresses in plants. *Biologia*, 74, 287–308. <https://doi.org/10.2478/s11756-019-00190-6>
- Kwak M-J, Kong HG, Choi K, Kwon S-K, Song JY, Lee J, Lee PA, Choi SY, Seo M, Lee HJ, Jung EJ, Park H, Roy N, Kim H, Lee MM, Rubin EM, Lee S-W, Kim JF (2018) Rhizosphere microbiome structure alters to enable wilt resistance in tomato. *Nature Biotechnology*, 36, 1100–1109. <https://doi.org/10.1038/nbt.4232>
- Lahti L, Shetty S, Blake T (2017) Tools for microbiome analysis in R. *Microbiome Package Version 0.99*, 88, 2012–2017.
- Lamichhane JR, Debaeke P, Steinberg C, You MP, Barbetti MJ, Aubertot J-N (2018) Abiotic and biotic factors affecting crop seed germination and seedling emergence: a conceptual framework. *Plant and Soil*, 432, 1–28. <https://doi.org/10.1007/s11104-018-3780-9>
- Ling N, Huang Q, Guo S, Shen Q (2011) *Paenibacillus polymyxa* SQR-21 systemically affects root exudates of watermelon to decrease the conidial germination of *Fusarium oxysporum* f.sp. *niveum*. *Plant and Soil*, 341, 485–493. <https://doi.org/10.1007/s11104-010-0660-3>
- Lipps SM, Samac DA (2022) *Pseudomonas viridiflava*: An internal outsider of the *Pseudomonas syringae* species complex. *Molecular Plant Pathology*, 23, 3–15. <https://doi.org/10.1111/mpp.13133>
- Lundberg DS, De Pedro Jové R, Pramoj Na Ayutthaya P, Karasov TL, Shalev O, Poersch K, Ding W, Bollmann-Giolai A, Bezrukov I, Weigel D (2022) Contrasting patterns of microbial dominance in the *Arabidopsis thaliana* phyllosphere. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 119, e2211881119. <https://doi.org/10.1073/pnas.2211881119>
- Martin M (2011) Cutadapt removes adapter sequences from high-throughput sequencing reads. *EMBnet journal*, 17, 10–12. <https://doi.org/10.14806/ej.17.1.200>
- Massart S (2023) Seed synthetic community matters and its impact on seedling is strain- and not species-dependant. *Peer Community in Microbiology*, 100008. <https://doi.org/10.24072/pci.microbiol.100008>
- Masson A-S, Ho Bich H, Simonin M, Nguyen Thi H, Czernic P, Moulin L, Bellafiore S (2020) Deep modifications of the microbiome of rice roots infected by the parasitic nematode *Meloidogyne graminicola* in highly infested fields in Vietnam. *FEMS Microbiology Ecology*, 96, fiae099. <https://doi.org/10.1093/femsec/fiae099>
- Matsumoto H, Fan X, Wang Y, Kusstatscher P, Duan J, Wu S, Chen S, Qiao K, Wang Y, Ma B, Zhu G, Hashidoko Y, Berg G, Cernava T, Wang M (2021) Bacterial seed endophyte shapes disease resistance in rice. *Nature Plants*, 7, 60–72. <https://doi.org/10.1038/s41477-020-00826-5>
- McMurdie PJ, Holmes S (2013) phyloseq: an R package for reproducible interactive analysis and graphics of microbiome census data. *PLoS one*, 8, e61217. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0061217>
- Moroenyane I, Tremblay J, Yergeau É (2021) Soybean Microbiome Recovery After Disruption is Modulated by the Seed and Not the Soil Microbiome. *Phytobiomes Journal*, 5, 418–431. <https://doi.org/10.1094/PBIOMES-01-21-0008-R>
- Mundt JO, Hinkle NF (1976) Bacteria within ovules and seeds. *Applied and Environmental Microbiology*, 32, 694–698. <https://doi.org/10.1128/aem.32.5.694-698.1976>
- Newcombe G, Harding A, Ridout M, Busby PE (2018) A Hypothetical Bottleneck in the Plant Microbiome. *Frontiers in Microbiology*, 9. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.01645>
- Oksanen J, Kindt R, Legendre P, O'Hara B, Stevens MHH, Oksanen MJ, Suggests M (2007) The vegan package. *Community ecology package*.
- Pfeilmeier S, Petti GC, Bortfeld-Miller M, Daniel B, Field CM, Sunagawa S, Vorholt JA (2021) The plant NADPH oxidase RBOHD is required for microbiota homeostasis in leaves. *Nature microbiology*, 6, 852–864. <https://doi.org/10.1038/s41564-021-00929-5>
- Raja K, Anandham R, Sivasubramaniam K (2019) Infusing microbial consortia for enhancing seed germination and vigour in pigeonpea (*Cajanus cajan* (L.) Millsp.). *Current Science*, 117, 2052–2058. <https://doi.org/10.18520/cs/v117/i12/2052-2058>
- Rocheffort A, Briand M, Marais C, Wagner M-H, Laperche A, Vallée P, Barret M, Sarniguet A (2019) Influence of Environment and Host Plant Genotype on the Structure and Diversity of the *Brassica napus* Seed Microbiota. *Phytobiomes Journal*, 3, 326–336. <https://doi.org/10.1094/PBIOMES-06-19-0031-R>
- Rocheffort A, Simonin M, Marais C, Guillerm-Erckelboudt A-Y, Barret M, Sarniguet A (2021) Transmission of Seed and Soil Microbiota to Seedling. *mSystems*, 6, e00446-21. <https://doi.org/10.1128/mSystems.00446-21>

- Rybakova D, Schmuck M, Wetzlinger U, Varo-Suarez A, Murgu O, Müller H, Berg G (2016) Kill or cure? The interaction between endophytic *Paenibacillus* and *Serratia* strains and the host plant is shaped by plant growth conditions. *Plant and Soil*, 405, 65–79. <https://doi.org/10.1007/s11104-015-2572-8>
- Ryu C-M, Kim J, Choi O, Kim SH, Park CS (2006) Improvement of biological control capacity of *Paenibacillus polymyxa* E681 by seed pelleting on sesame. *Biological Control*, 39, 282–289. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2006.04.014>
- Samad A, Antonielli L, Sessitsch A, Compant S, Trognitz F (2017) Comparative genome analysis of the vineyard weed endophyte *Pseudomonas viridiflava* CDRTc14 showing selective herbicidal activity. *Scientific Reports*, 7, 17336. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-16495-y>
- Shakya DD, Vinther F (1989) Occurrence of *Pseudomonas viridiflava* in Seedlings of Radish. *Journal of Phytopathology*, 124, 123–127. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0434.1989.tb04905.x>
- Shalev O, Karasov TL, Lundberg DS, Ashkenazy H, Pramoj Na Ayutthaya P, Weigel D (2022) Commensal *Pseudomonas* strains facilitate protective response against pathogens in the host plant. *Nature ecology & evolution*, 6, 383–396. <https://doi.org/10.1038/s41559-022-01673-7>
- Simonin M (2023) Script - Code for bioinformatics and Figures of Simonin et al. 2023 PCI Microbiol (Version 1). Zenodo. <https://doi.org/10.5281/zenodo.8403589>
- Simonin M, Briand M, Chesneau G, Rochefort A, Marais C, Sarniguet A, Barret M (2022) Seed microbiota revealed by a large-scale meta-analysis including 50 plant species. *New Phytologist*, 234, 1448–1463. <https://doi.org/10.1111/nph.18037>
- Simonin M, Dasilva C, Terzi V, Ngonkeu ELM, Diouf D, Kane A, Béna G, Moulin L (2020) Influence of plant genotype and soil on the wheat rhizosphere microbiome: evidences for a core microbiome across eight African and European soils. *FEMS Microbiology Ecology*, 96. <https://doi.org/10.1093/femsec/fiaa067>
- Torres-Cortés G, Bonneau S, Bouchez O, Genthon C, Briand M, Jacques M-A, Barret M (2018) Functional microbial features driving community assembly during seed germination and emergence. *Frontiers in Plant Science*, 9, 902. <https://doi.org/10.3389/fpls.2018.00902>
- Torres-Cortés G, Garcia BJ, Compant S, Rezki S, Jones P, Préveaux A, Briand M, Roulet A, Bouchez O, Jacobson D (2019) Differences in resource use lead to coexistence of seed-transmitted microbial populations. *Scientific Reports*, 9, 6648. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-42865-9>
- Truyens S, Weyens N, Cuypers A, Vangronsveld J (2015) Bacterial seed endophytes: genera, vertical transmission and interaction with plants. *Environmental Microbiology Reports*, 7, 40–50. <https://doi.org/10.1111/1758-2229.12181>
- Vogel CM, Potthoff DB, Schäfer M, Barandun N, Vorholt JA (2021) Protective role of the *Arabidopsis* leaf microbiota against a bacterial pathogen. *Nature Microbiology*, 6, 1537–1548. <https://doi.org/10.1038/s41564-021-00997-7>
- Walsh CM, Becker-Uncapher I, Carlson M, Fierer N (2021) Variable influences of soil and seed-associated bacterial communities on the assembly of seedling microbiomes. *The ISME Journal*, 15, 2748–2762. <https://doi.org/10.1038/s41396-021-00967-1>
- Wang Q, Garrity GM, Tiedje JM, Cole JR (2007) Naïve Bayesian Classifier for Rapid Assignment of rRNA Sequences into the New Bacterial Taxonomy. *Applied and Environmental Microbiology*, 73, 5261–5267. <https://doi.org/10.1128/AEM.00062-07>
- Wang NR, Wiesmann CL, Melnyk RA, Hossain SS, Chi M-H, Martens K, Craven K, Haney CH (2022) Commensal *Pseudomonas fluorescens* Strains Protect *Arabidopsis* from Closely Related *Pseudomonas* Pathogens in a Colonization-Dependent Manner (DS Guttman, Ed.). *mBio*, 13, e02892-21. <https://doi.org/10.1128/mbio.02892-21>
- Yousef-Coronado F, Travieso ML, Espinosa-Urgel M (2008) Different, overlapping mechanisms for colonization of abiotic and plant surfaces by *Pseudomonas putida*. *FEMS Microbiology Letters*, 288, 118–124. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2008.01339.x>

Supplementary information

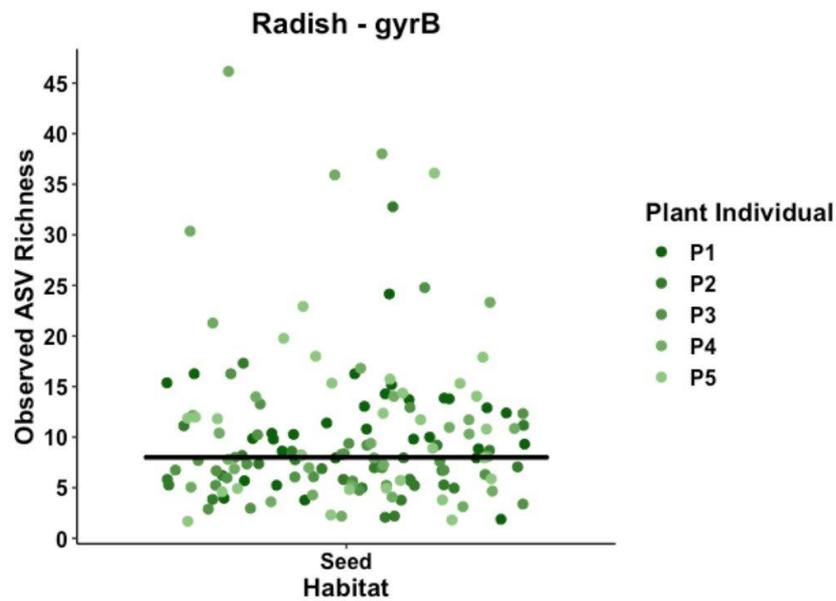


Figure S1: Observed ASV richness of individual mature seeds of radish (Flamboyant5). The data were obtained from Chesneau et al. (2022) based on 149 seeds analyzed. The horizontal line represents the median value at 8 ASVs per seed.

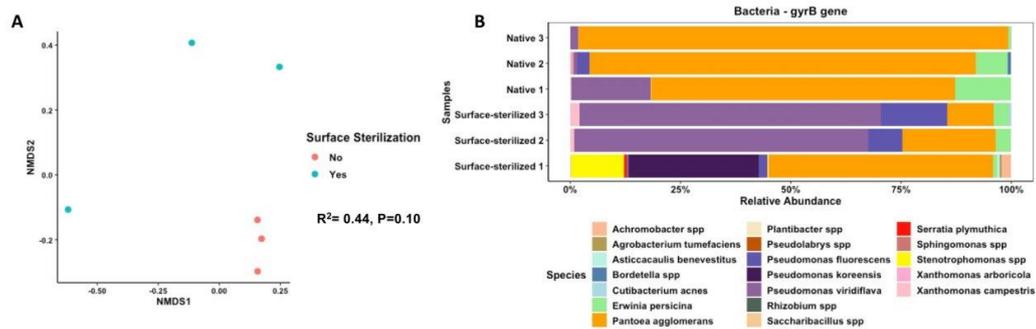


Figure S2: Characterization of the bacterial community of native and surface-sterilized seeds. A. Ordination based on Bray-Curtis distances, B. Taxonomic composition at the species level of each seed sample analyzed.

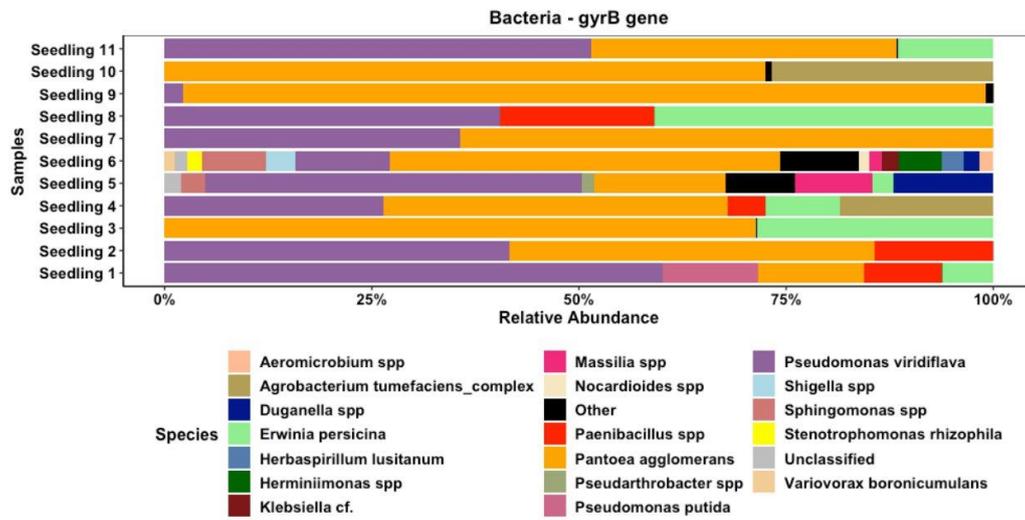


Figure S3: Bacterial taxonomic profile of the control seedlings at the species level. “Other” species represents taxa with a relative abundance inferior to 1%.

Titre : Impact des compétitions inter-microbiennes médiées par le système de sécrétion de type VI sur la dynamique de transmission du microbiote des graines aux plantules

Mots clés : microbiote des graines, compétition d'interférence, système de sécrétion de type VI, communautés synthétiques, *Stenotrophomonas rhizophila*, *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*.

Résumé : Les graines constituent la source d'inoculum initiale pour le microbiote des plantes. Lors de la germination, le relargage d'exsudats à proximité des graines déclenche une intense compétition microbienne qui joue un rôle moteur dans l'assemblage du microbiote des plantes. Ce travail de thèse vise à explorer le rôle de la compétition d'interférence médiée par le système de sécrétion de type VI (T6SS).

Le T6SS d'une souche de *Stenotrophomonas rhizophila*, une espèce bactérienne transmise efficacement aux plantules, a été utilisé comme modèle d'étude. Ce T6SS est impliqué dans l'inhibition de la croissance de nombreuses espèces bactériennes *in vitro*, dont la souche phytopathogène *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* 8004 (Xcc8004). Cette inhibition de croissance bactérienne est corrélée à la proximité phylogénétique et métabolique entre *S. rhizophila*

et les espèces bactériennes testées. L'activité antimicrobienne du T6SS de *S. rhizophila* limite la transmission de Xcc8004 de la graine de radis à la plantule en conditions gnotobiotiques. Cette activité module également la dynamique d'assemblage des communautés bactériennes lors de la transition graine-plantule en sol non stérile. La composition du consortium microbien co-inoculé sur graine influence l'avantage compétitif conféré par le T6SS à *S. rhizophila*.

La compétition d'interférence médiée par le T6SS intervient donc bien dans la dynamique d'assemblage du microbiote des plantes et l'inoculation de consortiums bactériens composés de bactéries porteuses de T6SS apparaît comme une solution potentielle de réduction de la transmission des agents phytopathogènes aux plantules

Title: Impact of inter-microbial competitions mediated by the type VI secretion system on the dynamics of seed microbiota transmission to seedlings

Keywords: seed microbiota, interference competition, type VI secretion system, synthetic communities, *Stenotrophomonas rhizophila*, *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*.

Abstract: Seeds represent the initial inoculum source for plant microbiota. During germination, the release of exudates near the seeds triggers intense microbial competitions, which play a pivotal role in the assembly of the plant microbiota. This thesis work aims to explore the role of interference competition mediated by the Type VI secretion system (T6SS).

The T6SS of a strain of *Stenotrophomonas rhizophila*, a bacterium efficiently transmitted to seedlings, was used as a study model. This T6SS inhibits the growth of many bacterial species *in vitro*, including the phytopathogenic strain *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* 8004 (Xcc8004). This inhibition of bacterial growth is correlated with the phylogenetic and metabolic proximity between *S. rhizophila* and the tested

bacterial species. The antimicrobial activity of *S. rhizophila* T6SS limits the transmission of Xcc8004 from radish seed to seedling under gnotobiotic conditions. Its activity also influences the dynamics of bacterial community assembly during the seed-to-seedling transition in non-sterile soil. The composition of the co-inoculated microbial consortium on the seed affects the competitive advantage conferred by the T6SS to *S. rhizophila*. Therefore, T6SS-mediated interference competition plays a significant role in the assembly dynamics of the plant microbiota, and the inoculation of bacterial consortia composed of T6SS-carrying bacteria appears as a potential solution for reducing the transmission of phytopathogenic agents to seedlings.