



HAL
open science

Génomique de l'altération des minéraux par la souche bactérienne *Collimonas pratensis* PMB3(1)

Laura Picard

► **To cite this version:**

Laura Picard. Génomique de l'altération des minéraux par la souche bactérienne *Collimonas pratensis* PMB3(1). Agronomie. Université de Lorraine, 2021. Français. NNT : 2021LORR0258 . tel-03699757

HAL Id: tel-03699757

<https://hal.univ-lorraine.fr/tel-03699757>

Submitted on 12 Feb 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.



AVERTISSEMENT

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

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

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

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

LIENS

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 122. 4

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

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

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



Ecole Doctorale : SIRENA
Laboratoires : Interactions Arbres Microorganismes UMR1136
Biogéochimie des Ecosystèmes Forestiers UR1138

Thèse

Présentée et soutenue publiquement pour l'obtention du titre de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE DE LORRAINE

Mention : MICROBIOLOGIE ENVIRONNEMENTALE

par **Laura PICARD**

Sous la direction de Stéphane UROZ et Marie-Pierre TURPAULT

Génomique de l'altération des minéraux par la souche bactérienne *Collimonas pratensis* PMB3(1)

Soutenance le 06 Décembre 2021

Membres du jury :

Directeur de thèse :	M Stéphane UROZ	Directeur de recherche, Centre INRAE Grand-Est, Champenoux
Co-directrice de thèse :	Mme Marie-Pierre TURPAULT	Directrice de recherche, Centre INRAE Grand-Est, Champenoux
Président de jury	M Stéphane VUILLEUMIER	Professeur, Université de Strasbourg
Rapporteurs :	Mme Florence WISNIEWSKI-DYÉ	Professeure, Université Claude Bernard Lyon 1, Villeurbanne
	M Lionel MOULIN	Directeur de recherche, IRD, Montpellier
Examineur :	M Patrick BILLARD	Maître de conférences, Université de Lorraine, Vandœuvre-lès-Nancy

Résumé

Dans les régions tempérées, les minéraux et les roches représentent la source principale de cations nutritifs des sols des écosystèmes à faibles intrants telles que les forêts. Dans de tels environnements pauvres en nutriments et non-amendés, l'accès et le recyclage des cations nutritifs sont des processus clés pour la croissance et la productivité des arbres. Cependant, ces cations nutritifs ne sont pas directement accessibles aux racines des arbres car piégés dans la matière organique ou dans les minéraux et roches des sols. En conséquence, le processus d'altération des minéraux joue un rôle essentiel car il contribue à restaurer la fertilité des sols et à fournir des nutriments inorganiques nécessaires à la croissance des arbres. L'altération des minéraux peut être due à des processus abiotiques (température, pH, érosion...) ou des processus biotiques (plantes, champignons, bactéries). Parmi les acteurs biotiques, les bactéries sont capables d'altérer les minéraux par différents mécanismes comme la production de protons (acidolyse) ou la production de molécules chélatrices (complexolyse). Néanmoins, les gènes et protéines impliqués dans l'altération des minéraux par les bactéries sont mal connus. Dans le cadre de cette thèse, la souche bactérienne *Collimonas pratensis* PMB3(1) a été utilisée comme modèle pour identifier les gènes de l'altération. Cette souche a été isolée de la mycorrhizosphère du chêne et est tout particulièrement efficace pour altérer les minéraux. Dans cette thèse l'analyse du génome de la souche PMB3(1) a mis en évidence l'absence de certains gènes décrits dans l'altération (comme les glucose déshydrogénases PQQ dépendantes) et a souligné la nécessité de développer deux approches complémentaires : avec et sans *a priori*. (i) La démarche sans *a priori* a été développée *via* la création d'une banque de mutants aléatoires. Le criblage de cette banque de mutants sur des biotests mimant l'altération des minéraux a permis de sélectionner 3 mutants impactés dans leur capacité à altérer les minéraux. La caractérisation de ces mutants a révélé des mutations dans différents gènes impliqués dans la synthèse d'une glucose/méthanol/choline oxydoréductase (GMC). La comparaison de composés chimiques présents dans le surnageant de la souche sauvage et des mutants a révélé que cette GMC était responsable de la métabolisation du glucose en gluconate et de la production de protons, conduisant à une acidification du milieu et à une altération des minéraux par acidolyse. (ii) La démarche avec *a priori* a été réalisée par la création d'un mutant ciblé au niveau du gène *mbaA* codant pour un NRPS (Non-Ribosomal Peptide Synthetase) responsable de la synthèse de sidérophore. L'utilisation conjointe de méthodes de chromatographie (HPLC) et de spectrométrie de masse (LC-ESI-MS et MS/MS) a permis de caractériser chimiquement ce sidérophore, qui a été identifié comme étant une malléobactine X. La comparaison de la souche

sauvage et du mutant *mbaA* a révélé que la production de la malléobactine est impliquée dans l'altération des minéraux par complexolyse et ce dans un milieu avec un fort pouvoir tampon. Les tests d'altération réalisés avec différents types de minéraux en présence de deux sources de carbone (glucose ou mannitol) et deux milieux ayant un pouvoir tampon différent ont révélé que la souche PMB3(1) était efficace pour altérer tous les minéraux testés et que les deux agents altérants (GMC et malléobactine) avaient un effet similaire quel que soit le type de minéral. De plus, la source de carbone et le tampon du milieu avaient une forte influence sur l'efficacité des agents altérants. Enfin, des résultats préliminaires ont été obtenus sur la régulation des gènes et protéines en fonction de la disponibilité en nutriments inorganiques et de la présence du minéral par des techniques de transcriptomique et protéomique. Pour conclure, cette thèse a permis de (i) découvrir de nouveaux gènes liés à l'altération des minéraux par les bactéries, (ii) mettre en évidence l'influence des facteurs environnementaux dans l'efficacité des mécanismes d'altération utilisés par les bactéries.

Mots clés : altération des minéraux, génétique, *Collimonas*, glucose/méthanol/choline oxydoréductase, sidérophore, malléobactine

Abstract

In temperate regions, minerals and rocks represent one of the main sources of nutritive cations in the soil of low-input ecosystems such as forests. In such nutrient-poor and non-amended environments, the access and the recycling of nutritive cations are key processes for tree growth and productivity. However, these nutritive cations are almost inaccessible to the tree roots as they are entrapped into the organic matter or into the soil minerals and rocks. Consequently, the mineral weathering process is essential as it allows the restauration of soil fertility and provides the inorganic nutrients for tree growth. The mineral weathering can be due to abiotic (temperature, pH, erosion...) or biotic (plants, fungi, bacteria...) processes. Among biotic processes, bacteria are able to weather minerals by different mechanisms such as the production of protons (acidolysis) or the production of chelating molecules (complexolysis). However, genes and proteins involved in mineral weathering by bacteria are not elucidated yet. As part of this thesis, a bacterial *Collimonas pratensis* strain PMB3(1) was used as a model to identify genes involved in mineral weathering. This strain was isolated from oak mycorrhizosphere and is efficient to weather minerals. In this thesis, the analysis of the genome of the strain PMB3(1) evidenced the absence of certain genes described in mineral weathering (such as PQQ-dependent glucose dehydrogenases) and highlighted the need to develop two complementary approaches: with and without *a priori*. (i) The without *a priori* approach, has been developed with the building of a mutant library with the insertion of a plasposon pOT-182. The screening of this mutant library on biotests miming mineral weathering allowed the selection of three mutants impacted in their mineral weathering ability. The characterisation of these mutants revealed mutations in different genes involved in a glucose/methanol/choline oxidoreductase (GMC) synthesis. Comparisons between wild type and mutants chemical compounds in the culture supernatants showed that this GMC was able to convert glucose to gluconate and produce protons leading to the acidification of the medium and minerals acidolysis. (ii) The with *a priori* approach was the building of a *mbaA* mutant coding for a NRPS (non-ribosomal peptide synthetase) responsible of siderophore biosynthesis. The combined use of chromatography (HPLC) and mass spectrometry (LC-ESI-MS and MS/MS) methods allowed to chemically characterize the siderophore as a malleobactin X. Comparisons between wild type and *mbaA* mutant strains revealed that the production of malleobactin was involved in mineral weathering by complexolysis in a strong buffered medium. Weathering tests performed with different mineral types in presence of two carbon sources (glucose or mannitol) and two media with different buffering capacities showed that the strain PMB3(1) was efficient to weather all

tested minerals and that weathering molecules (GMC and malleobactin) had a similar effect whatever the mineral type. Furthermore, the carbon source and the buffering capacity had a strong influence on weathering molecules efficiency. Finally, preliminary results have been obtained on the regulation of genes and proteins according to inorganic nutrients availability and the presence of minerals by transcriptomic and proteomic technics. To conclude, this thesis (i) allowed the discovery of new genes involved in mineral weathering by bacteria, (ii) evidenced the influence of environmental factors in efficiency of molecular mechanisms involved in mineral weathering and used by bacteria.

Key words: mineral weathering, genetic, *Collimonas*, glucose/methanol/choline oxidoreductase, siderophore, malleobactin

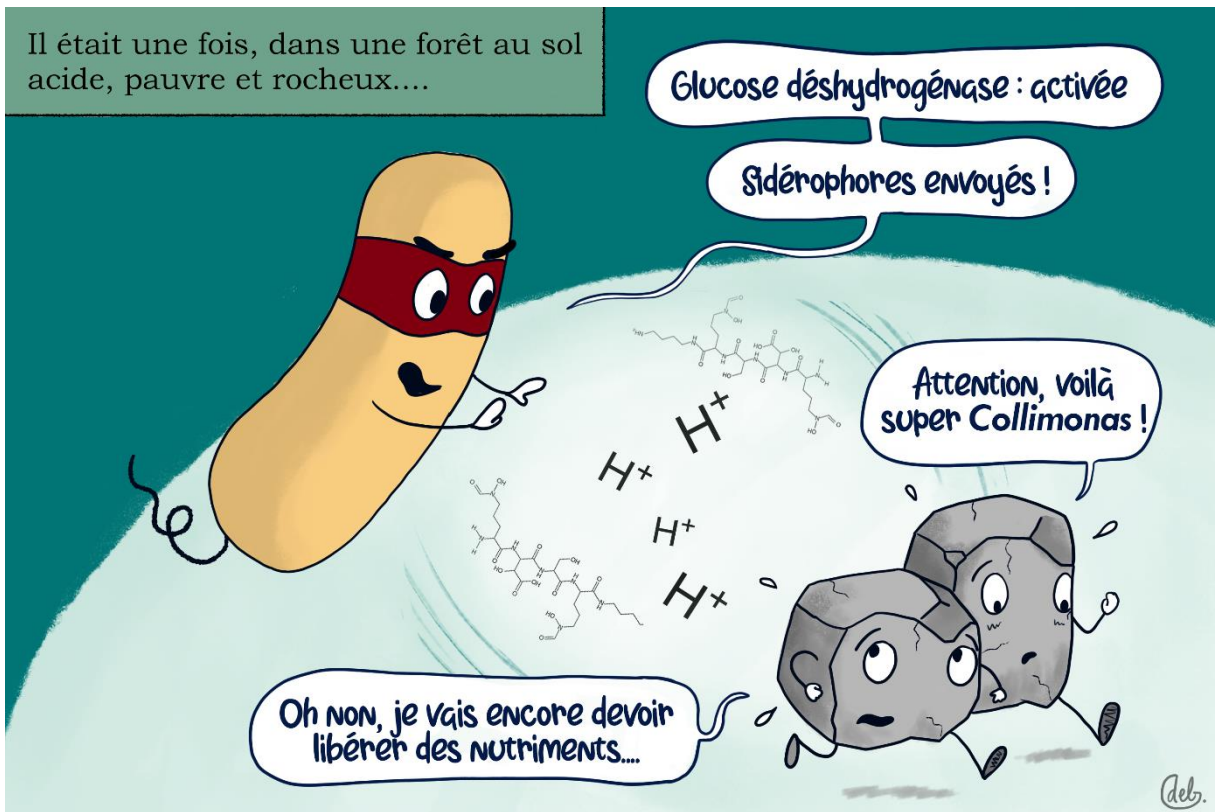
Il était une fois, dans une forêt au sol acide, pauvre et rocheux...

Glucose déshydrogénase : activée

Sidérophores envoyés !

Attention, voilà super Collimonas !

Oh non, je vais encore devoir libérer des nutriments...



deb.

Remerciements



Merci aux jurys qui ont accepté de lire et évaluer ma thèse.



Merci à Stéphane Uroz pour avoir partagé ta passion pour les bactéries, et tes connaissances sur le sujet. Merci de m'avoir tirée vers le haut, de m'avoir accompagnée, je dirai même poussée jusqu'au bout de mes capacités. Merci de m'avoir fait confiance (j'ai appris que ce n'était pas si simple). Merci pour ta franchise, pour avoir été toujours disponible (espèce rare pour un directeur de recherche), pour ta pédagogie et tes schémas qui aident à voir plus clair. Merci pour avoir toujours voulu le meilleur pour moi.



Merci à Marie-Pierre Turpault pour avoir partagé votre passion pour les forêts et les minéraux. J'ai découvert un nouvel univers qui a revalorisé les minéraux à mes yeux. Merci pour votre gentillesse, votre côté humain et bienveillant.



Merci à Ludovic Vial et Yves Dessaux pour avoir accepté de faire partie des membres de mon comité de suivi et pour m'avoir aiguillé avec bienveillance pendant ma thèse.



Merci à tous les co-auteurs avec qui j'ai travaillé et en particulier Cédric Paris qui maîtrise mieux que personne son spectromètre de masse à Orbitrap et qui a suivi de près la découverte de la malléobactine X.



Merci à toute l'équipe IAM écogénomique qui m'a accueilli chaleureusement pour m'avoir permis de me sentir à l'aise, pour cette bonne ambiance, pour les bons moments passés tous ensemble pour discuter de sciences, ou un peu moins... je pense aux repas de Noël et le « secret santa », les pauses café/thé qui m'ont beaucoup manqué pendant cette période de Covid...



Merci à Lucas pour ses conseils sur R mais pas que... les sorties « chiens », les debriefs sur Game of Thrones, m'avoir fait découvrir Outlander (je ne m'en suis toujours pas remise... « sing me a song of a lass that is gone ») et bien sûr la belotte avec un jeu de cartes un peu spécial !



Merci à Laure pour m'avoir accompagné dans mes extractions d'ARN, ta rigueur et tes conseils. Ça, c'était la partie travail... Merci pour les soirées jeux (toujours plus drôles quand il y a du « fight ») et de m'avoir appris les vraies règles du UNO (et oui, on peut compter des points au UNO). En parlant de soirées jeux...



Merci à Jonas qui a mis un peu de vie et d'animation entre doc, postdoc et pour les conversations passionnées sur les tiques, sans oublier... les ornithorynques !



Merci à Pauline qui a reçu le prestigieux titre de Miss Comté, merci pour avoir apporté une super ambiance dans le labo, pour les potins partagés accoudées au garde-corps, pour les M&M's, pour ton accent franc-comtois sans pareil, ta gentille susceptibilité et pour tous les bons moments passés ensemble.



Merci à Fadwa ma voisine de bureau durant cette dernière année (la plus difficile), j'espère ne pas t'avoir fait trop peur... Merci pour avoir aidé au triage du grenat (je ne dirais pas à quels moments...). Merci pour ta franchise, le partage de potins (oui ça ne s'arrête jamais), et ton accompagnement dans les difficultés à trouver un plat végétarien à la cantine. Je te lègue les plantes du bureau, n'oublie pas de les arroser !



Merci à Christine qui m'a permis de manger le midi à heures fixes (départ à la cantine à 11h50 pour être précise) et ses conseils sur l'utilisation des huiles essentielles.



Merci à mes parents et ma famille pour m'avoir permis de faire des études et d'assouvir ma soif de connaissances sur les bactéries. Merci d'avoir cru en moi.



Merci à Déborah, on ne pouvait pas imaginer en école maternelle qu'on allait conserver cette amitié si longtemps, encore plus étonnant, qu'on allait partager autant de passions en commun dont la science ! Probablement parce qu'on a co-évolué ensemble influençant mutuellement nos futurs. Merci pour cette belle illustration et merci d'avoir eu cette curiosité de découvrir mon sujet de thèse.



Merci à Anaïs et Coralie avec qui je partage depuis bien avant ma thèse ma passion pour les sciences et les bactéries. Merci de m'avoir permis de tester mes capacités de vulgarisatrice scientifique. Merci d'avoir toujours été là pendant les meilleurs et pires moments de cette grande aventure. Des conversations interminables au téléphone, aux week-ends toujours trop courts, promis je descends bientôt dans le Sud !



Merci à Warren sans qui rien de tout cela n'aurait été possible. Merci de m'avoir accompagné jusqu'en Lorraine et je sais au combien ça te coûte. Merci d'avoir cru en moi et de m'avoir soutenu pendant ces trois années de thèse et bien avant. Merci de m'avoir appris à gérer mon stress, d'être « trANquille ». Merci pour tes conseils de chimiste, de m'avoir écouté parler de ma thèse pendant ces trois années. Merci d'avoir relu ma thèse (enfin une partie : trop long...). Merci d'être à mes côtés.



Merci à Ginger et Pepper alias les toutoutes pour m'avoir permis de me vider la tête tous les matins dans les champs de Laneuvelotte et qui ont partagé des grandes révélations et idées au milieu de rien.

SOMMAIRE

INTRODUCTION	1
1. Contexte	2
1.1. La forêt et son écosystème, définition et bénéfices	2
1.1.1. La forêt	2
1.1.2. Les services écosystémiques	2
1.2. Les particularités de l'écosystème forestier	3
1.2.1. Les arbres et leurs besoins nutritifs	3
1.2.2. Le sol des forêts tempérées	4
1.2.2.1. Le sol	4
1.2.2.2. Singularités des sols forestiers	4
1.2.2.3. Caractéristiques chimiques	5
1.2.2.4. Caractéristiques physiques du sol et conséquences sur l'arbre	6
1.3. La provenance des nutriments	8
1.3.1. Les apports internes : la décomposition de la matière organique	8
1.3.2. Les apports extérieurs	9
1.3.2.1. Les dépôts atmosphériques	9
1.3.2.2. L'altération des minéraux	10
1.3.3. Les pertes de nutriments inorganiques et perturbations	10
1.3.3.1. Le lessivage	10
1.3.3.2. L'implication de l'Homme	11
2. Les minéraux et leur altération	12
2.1. Roches et minéraux : description et caractéristiques	12
2.1.1. Classification et focus sur cinq minéraux d'intérêt	13
2.1.1.1. Les oxydes et hydroxydes : focus sur l'hématite	13
2.1.1.2. Les minéraux phosphatés : focus sur l'apatite	13
2.1.1.3. Les silicates : focus sur l'olivine, le grenat et la biotite	14
2.2. L'altération des minéraux : différents processus impliqués	15
2.2.1. L'altération physique	15
2.2.1.1. La division	15
2.2.2. L'altération chimique	16
2.2.2.1. La dissolution	16
2.2.2.2. La néoformation	16
2.2.2.3. La transformation	17
2.2.3. Les mécanismes chimiques de l'altération	17
2.2.3.1. L'acidolyse	17
2.2.3.2. La complexolyse	18
2.2.3.3. L'oxydo-réduction	18
2.2.4. Les minéraux ont une altérabilité variable	18
2.3. L'altération des minéraux, un phénomène répandu aux conséquences diverses	19
2.3.1. Contextes divers de l'altération des minéraux	19
2.3.2. Les conséquences de l'altération des minéraux sur l'environnement	20
2.3.2.1. Focus sur la dissolution des minéraux dans les sols	20
2.4. Implication des acteurs biotiques dans l'altération des minéraux	22
2.4.1. Implication des insectes et vers de terre	22
2.4.2. Implication des plantes	23
2.4.3. Implication des champignons	24
2.4.4. Implication des lichens : des pionniers dans la colonisation des roches	25
2.4.5. Implication des bactéries	26

3.	Les bactéries altérantes	26
3.1.	Les bactéries altérantes et la rhizosphère	27
3.1.1.	La (myco)rhizosphère et ses exsudats	27
3.1.2.	La rhizosphère un habitat pour les bactéries altérantes	28
3.1.3.	Enrichissement des bactéries altérantes au niveau de la (myco)rhizosphère	28
3.2.	Les facteurs qui influencent l'enrichissement des bactéries altérantes	29
3.2.1.	Facteurs extrinsèques	29
3.2.1.1.	La saisonnalité	29
3.2.1.2.	La disponibilité en nutriments inorganiques	30
3.2.2.	Facteurs intrinsèques	31
3.3.	Les facteurs qui influencent l'efficacité des bactéries altérantes	32
3.3.1.	Facteur extrinsèque : la source de carbone et d'azote	32
3.3.2.	Facteur intrinsèque : le type de minéral	33
3.3.3.	Quels sont les genres et espèces bactériennes efficaces pour altérer les minéraux ?	33
3.4.	Les bactéries altérantes, des bactéries promotrices de la croissance des plantes	34
3.4.1.	Application des bactéries altérantes	34
3.4.2.	Les limites	36
3.4.3.	Les avantages de l'utilisation des bactéries altérantes et minéraux pour l'amendement des sols	37
4.	Les mécanismes moléculaires impliqués dans l'altération	37
4.1.	Acidolyse et métabolisme	37
4.1.1.	Les voies métaboliques du glucose	38
4.1.2.	La voie d'oxydation directe du glucose	39
4.1.3.	Les glucose déshydrogénases	39
4.1.4.	Le cofacteur PQQ	40
4.2.	L'acido-complexolyse et la complexolyse	41
4.2.1.	Les acides organiques	42
4.2.1.1.	Le citrate	42
4.2.1.2.	Acétate	43
4.2.2.	Les sidérophores	43
4.2.3.	Les substances polymériques extracellulaires et les flagelles	44
4.3.	L'oxydo-réduction	45
4.3.1.	En condition oxique	45
4.3.2.	En condition anoxique	46
4.4.	D'autres mécanismes moléculaires impliqués ?	47
4.4.1.	L'anhydrase carbonique	47
4.4.2.	Des mécanismes indirects	48
4.4.2.1.	L'énolase	48
4.4.2.2.	La formation de ponts disulfures (DsbA)	48
4.5.	La régulation des mécanismes moléculaires de l'altération	49
4.5.1.	Effet de la carence en phosphate	49
4.5.2.	Effet de la présence du minéral	50
5.	Questions et objectifs de la thèse	51

1.	Le genre bactérien <i>Collimonas</i>	56
1.1.	Historique	56
1.2.	La taxonomie	56
1.3.	Le contexte écologique	56
1.3.1.	Les méthodes de détection : cultivable et non-cultivable	56
1.3.2.	Des environnements privilégiés	57
1.4.	Caractéristiques phénotypiques et génétiques	58
1.4.1.	La mycophagie	58
1.4.2.	L'altération des minéraux	59
1.4.2.1.	L'altération des minéraux est-elle un trait fonctionnel du genre bactérien <i>Collimonas</i> ?	59
1.4.2.2.	Acidolyse ou complexolyse ?	60
1.4.2.3.	La source de carbone a-t-elle un effet sur le potentiel d'altération ?	61
1.4.2.4.	Quels sont les déterminants génétiques de l'altération des minéraux par les <i>Collimonas</i> ?	61
1.5.	Pourquoi le genre <i>Collimonas</i> est-il un bon modèle d'étude ?	62
2.	Focus sur la souche <i>Collimonas pratensis</i> PMB3(1)	63
2.1.	Origine	63
2.2.	Analyses préliminaires	63
2.2.1.	Matériels et méthodes	63
2.2.1.1.	Analyses moléculaires	63
2.2.1.2.	Préparation d'un inoculum calibré de la souche PMB3(1)	64
2.2.1.3.	Tests de croissance	64
2.2.1.4.	Antibiogramme	64
2.2.1.5.	Le métabolisme	65
2.2.1.6.	Le potentiel d'altération des minéraux	65
2.2.2.	Résultats	66
2.2.2.1.	Croissance	66
2.2.2.2.	Antibiogramme	66
2.2.2.3.	Le métabolisme	66
2.2.2.4.	Le potentiel d'altération	67
3.	Quel est le lien entre la capacité d'altération des minéraux et le génome ?	68
3.1.	<u>Article 1</u> : Draft genome sequence of <i>Collimonas pratensis</i> strain PMB3(1), an effective mineral-weathering and chitin-hydrolyzing bacterial strain	68
3.1.1.	Announcement	70
3.1.2.	Acknowledgements	71
3.1.3.	References	72
3.2.	Analyse complémentaire du génome ; y a-t-il des gènes candidats potentiellement impliqués dans l'altération des minéraux ?	74
3.2.1.	Quel type de glucose déshydrogénase possède PMB3(1) dans son génome ?	74
3.2.2.	<i>Collimonas pratensis</i> PMB3(1) possède-t-il des gènes de synthèse de PQQ ?	75
3.2.3.	Peut-on identifier sur la base de l'annotation du génome les gènes impliqués dans la synthèse de sidérophore ?	75
3.2.4.	D'autres gènes présents dans le génome de PMB3(1) pourraient-ils être impliqués dans l'altération des minéraux ?	76
4.	Conclusion	76

CHAPITRE 2

La Glucose/Méthanol/Choline oxydoréductase, une enzyme impliquée dans l'altération des minéraux *via* un processus d'acidolyse

1.	Préambule	79
2.	Article 2 : Identification of a novel type of glucose dehydrogenase involved in the mineral weathering ability of <i>Collimonas pratensis</i> strain PMB3(1)	79
2.1.	Introduction	83
2.2.	Materials and methods	85
2.3.	Results	92
2.4.	Discussion	98
2.5.	Conclusion	102
2.6.	Acknowledgments	103
2.7.	References	103
2.8.	Supporting information	110

CHAPITRE 3

Le sidérophore de la souche *Collimonas pratensis* PMB3(1) est impliqué dans l'altération de minéraux secondaires *via* son action complexante

1.	Préambule	125
2.	Article 3 : The mineral weathering ability of <i>Collimonas pratensis</i> PMB3(1) involves a Malleobactin-mediated iron acquisition system	125
2.1.	Introduction	130
2.2.	Materials and methods	132
2.3.	Results	138
2.4.	Discussion	143
2.5.	Conclusion	148
2.6.	Acknowledgments	149
2.7.	References	149
2.8.	Supporting information	156

CHAPITRE 4

Les mécanismes moléculaires impliqués dans l'altération des minéraux par *Collimonas pratensis* PMB3(1) sont-ils influencés par les facteurs intrinsèques et extrinsèques ?

1.	Préambule	163
2.	Introduction	163
3.	Matériels et méthodes	166
3.1.	Matériel minéral	166
3.2.	Matériel biologique	167
3.3.	Préparation de l'inoculum bactérien	167
3.4.	Biotests	167
3.4.1.	Solubilisation du phosphate	168
3.4.2.	Acidification du milieu	168
3.4.3.	La production de sidérophore	168

3.5.	Altération abiotique des minéraux	168
3.5.1.	Préparation des solutions	168
3.5.2.	Mesure de l'altérabilité des minéraux testés	168
3.6.	Altération biotique des minéraux	169
3.6.1.	Les milieux de culture utilisés	169
3.6.2.	Test d'altération biotique	169
3.7.	Mesure de l'altération des minéraux et calcul du taux de dissolution	170
3.8.	Analyses statistiques	170
4.	Résultats	171
4.1.	Evaluation de l'altérabilité des minéraux	171
4.2.	Caractérisation phénotypique des mutants	171
4.3.	Altération des minéraux par la souche PMB3(1) et ses mutants	172
4.3.1.	Effet des facteurs extrinsèques	172
4.3.1.1.	Effet du milieu de culture sur l'efficacité d'altération par la souche sauvage PMB3(1)	172
4.3.1.2.	Effet de la source de carbone sur l'efficacité à altérer les minéraux par la souche sauvage	173
4.3.1.3.	Effet du milieu de culture et de la source de carbone sur les mécanismes moléculaires de l'altération	174
4.3.2.	Effet des propriétés du minéral (facteurs intrinsèques)	174
4.3.2.1.	Effet du type de minéral sur l'efficacité d'altération	175
4.3.2.2.	Effet du type de minéral sur les mécanismes moléculaires de l'altération	175
5.	Discussion	176
5.1.	Les mécanismes moléculaires de l'altération des minéraux influencés par les facteurs extrinsèques	177
5.1.1.	Effet de la source de carbone	177
5.1.2.	Effet du tampon du milieu	178
5.1.3.	Effet synergique des mécanismes	178
5.2.	Les facteurs intrinsèques et l'altération des minéraux par la souche PMB3(1)	179
5.2.1.	Le cas particulier de l'olivine	180
5.3.	Relation entre efficacité d'altération des bactéries et altérabilité des minéraux	180
6.	Conclusion	181

CHAPITRE 5

Apport des méthodes de transcriptomique et protéomique dans la compréhension des mécanismes engagés dans l'interaction et l'altération des minéraux par la souche *Collimonas pratensis* PMB3(1)

182

1.	Préambule	183
2.	<u>Article 5</u> : Dual transcriptomics and proteomics analyses of the early stage of interaction between <i>Caballeronia mineralivorans</i> PML1(12) and mineral	183
2.1.	Présentation succincte de l'article	184
2.1.1.	Le design expérimental	184
2.1.2.	Les principaux résultats	185
2.1.2.1.	Les analyses chimiques	185
2.1.2.2.	Les gènes différentiellement régulés en fonction des traitements	185
2.1.2.3.	Focus sur les probables glucose déshydrogénases de PML1(12) et leur potentielle fonction dans l'altération des minéraux	186
2.1.2.4.	Focus sur les systèmes d'acquisition du fer de PML1(12)	187

2.1.3.	Conclusion	187
2.2.	Parallèle entre l'étude présentée ci-dessus et mes travaux de recherche	188
2.2.1.	Intérêt d'étudier ces questions de recherche sur la souche modèle <i>Collimonas pratensis</i> PMB3(1)	188
2.2.2.	Les nouvelles questions de recherches abordées dans la suite de ce chapitre	189
2.2.3.	Interaction entre bactéries et minéraux, les intérêts d'une étude en cinétique	189
3.	Introduction	190
4.	Matériels et méthodes	194
4.1.	Matériel biologique	194
4.2.	Matériel minéral	194
4.3.	Mise en place de la cinétique d'altération	195
4.3.1.	Préparation de l'inoculum bactérien	195
4.3.2.	Design expérimental	195
4.3.3.	Conditionnement des échantillons	196
4.4.	Dénombrement	196
4.5.	Analyses chimiques sur le surnageant	196
4.5.1.	Mesure des acides organiques	197
4.5.2.	Mesure des éléments chimiques (ICP)	197
4.6.	Analyses moléculaires	197
4.6.1.	Extraction protéique et spectrométrie de masse	197
4.6.2.	Extraction d'ARN	198
4.7.	Traitement bioinformatique des données	198
4.8.	Analyses statistiques	199
5.	Résultats préliminaires	199
5.1.	Analyses chimiques	200
5.2.	Etat physiologique	200
5.3.	Analyses moléculaires	201
5.3.1.	Statistiques des résultats	201
5.3.2.	Approche sans <i>a priori</i>	202
5.3.2.1.	Analyses multivariées combinant les approches de transcriptomique et protéomique	202
5.3.2.2.	Les clusters de groupes orthologues (COG)	202
5.3.2.3.	Analyse détaillée des gènes différentiellement exprimés et des protéines différentiellement produites	203
5.3.3.	Approche avec <i>a priori</i>	207
5.3.3.1.	Le métabolisme du glucose	208
5.3.3.2.	Les mécanismes d'acquisition du fer	209
6.	Discussion	210
6.1.	Approche sans <i>a priori</i>	210
6.1.1.	Vision globale des données	210
6.1.2.	Analyse des top20	211
6.2.	Approche avec <i>a priori</i>	212
6.2.1.	La régulation de l'expression des enzymes liées au métabolisme du glucose	212
6.2.2.	Les systèmes d'acquisition du fer	213
6.3.	Comparaison avec PML1(12)	214
6.3.1.	Effet de carence	214
6.3.2.	Effet de la présence du minéral	214

7. Conclusion	215
----------------------	------------

CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES	216
--------------------------------------------	------------

1. Synthèse des résultats	217
2. Discussion	217
2.1. Une approche sans <i>a priori</i> indispensable à la problématique des gènes de l'altération des minéraux	217
2.2. Le glucose et les mécanismes moléculaires de l'altération des minéraux	218
2.2.1. Les voies de métabolisation du glucose	218
2.2.2. Les glucose déshydrogénases impliquées dans la voie d'oxydation directe du glucose	219
2.2.3. Etude phylogénétique des différentes déshydrogénases identifiées chez PMB3(1) et PML1(12)	220
2.2.4. Expression et régulation des enzymes liées aux voies métaboliques du glucose	222
2.3. Les systèmes d'acquisition du fer	223
2.3.1. Les sidérophores	224
2.3.2. La production du sidérophore et l'expression des gènes de synthèse de sidérophore sont-elles régulées ?	224
2.3.2.1. Impact de la disponibilité en métaux (Fe, Al et Mn) sur la production de malléobactine	224
2.3.2.2. Régulation de l'expression des gènes de synthèse de sidérophore	225
2.3.3. Autres systèmes d'acquisition du fer	226
2.4. Rôle indirect du système TAT dans l'altération des minéraux	228
2.4.1. Les protéines transportées par le système TAT	228
2.4.2. La régulation du système TAT et ses conséquences	231
2.5. Interaction étroite entre <i>Collimonas pratensis</i> PMB3(1) et le minéral	231
2.6. Les minéraux, un habitat pour les bactéries mais pas que...	233
2.7. Les résultats obtenus peuvent-ils être élargis au genre <i>Collimonas</i> ?	234
2.8. Remise dans un contexte écologique	236
3. Critiques des approches	238
4. Perspectives	239
4.1. Les sources de carbone, des pistes à approfondir	239
4.2. Le sidérophore : un rôle dans l'altération au-delà de la complexation du fer	240
4.3. La capacité à promouvoir la croissance des plantes de la souche PMB3(1)	242
4.4. Perspectives plus larges	243

REFERENCES	245
-------------------	------------

ANNEXES	270
----------------	------------

Annexe 1 : Article 5 : Dual transcriptomics and proteomics analyses of the early stage of interaction between <i>Caballeronia mineralivorans</i> PML1(12) and mineral	271
1.1. Introduction	275
1.2. Materials and methods	277

1.3.	Results	283
1.4.	Discussion	291
1.5.	Conclusion	299
1.6.	Acknowledgments	299
1.7.	References	300
1.8.	Supporting information	307
Annexe 2 : Milieux de culture		327
1.1.	Milieu AB	327
1.2.	Milieu LBm	327
1.3.	Milieu TCP	307
1.4.	Milieu CAS	328
1.5.	Milieu BHm	328
Annexe 3 : Publications et communications scientifiques		329
Annexe 4 : Formations réalisées au cours de ma thèse		331

Liste des abréviations

AB	Milieu agrobacterium minimal	GDH-	Glucose déshydrogénase dépendante
ABm	Milieu AB mannitol	PQQ	du cofacteur PQQ
AC	Analyse chimique	gdhS	Petite sous-unité de la GDH
ADH	Alcool déshydrogénase	Gen/Gm	Gentamycine
ADH-	Alcool déshydrogénase PQQ	GGDC	Genome-to-Genome Distance
PQQ	dépendante		Calculator
ADN	Acide désoxyribonucléique	GIK	Glucokinase
AE	Acidité d'échange	GltK	Glucose transporteur
Amp	Ampicilline	GMC	Glucose/méthanol/choline
ARN	Acide ribonucléique		oxydoréductase
ATP	Adenosine triphosphate	Gnt	6-phosphogluconate déshydrogénase
B	BHm carencé en Fe et Mg	GntK	Gluconokinase
BB	BHm carencé avec Biotite	GntP	Gluconate perméase
BBP	BHm carencé avec Biotite et PMB3(1)	H ⁺	Proton
BC	BHm complet	HCl	Acide chloridrique
BCP	BHm complet avec PMB3(1)	HPLC	Chromatographie liquide à haute
BHm	Milieu Bushnell Haas modifié		pression
BLAST	Basic Local Alignment Search Tool	ICP	Inductively coupled plasma
BP	BHm carencé avec PMB3(1)	ICP-	Inductively coupled plasma - optical
CA	Anhydrase carbonique	OES	emission spectrometry
CAS	Chromazurol-S	IGN	Institut National de l'Information
CDS	Séquence codante		Géographique et Forestière
CEC	Capacité d'échange cationique	K	Taux de dissolution
Chl	Chloramphénicol	Kan	Kanamycine
COG	Clusters de groupes orthologues	KguD	2-keto-gluconate réductase
DEG	Gènes différentiellement exprimés	KguK	2-keto-gluconate kinase
DFAM	Desferrioxamine-B mesylate	KguT	2-keto-gluconate transporter
DFO-B	Deferoxamine-B	Km	Constante de dissolution
DO	Densité optique	LBm	Milieu Luria-Bertani modifié
DPP	Protéines différentiellement produites	LC-ESI-	Spectrométrie de masse à ionisation
ED	Voie Entner-Doudoroff	HRMS	électrospray haute résolution
Eda	2-keto-3-deoxy gluconate aldolase	m/z	Masse sur charge
Edd	Phosphogluconate déhydratase	MAGE	Magnifying Genomes sur la
EMP	Voie Embden-Meyerhof-Parnas		plateforme : Microscope
EPS	Substances polymériques	MBwB	BHm mannitol avec biotite avec
	extracellulaires		bactéries
FAD	Flavine adénine dinucléotide	MDH	Méthanol déshydrogénase
FAO	Organisation pour l'alimentation et	MES	Acide 2-(N-
	l'agriculture		morpholino)éthanosulfonique
FC	FoldChange	MM	Matière minéral
FDH	Fructose déshydrogénase	MO	Matière organique
FDR	False discovery rate	MW	Mineral weathering
GA	Gluconate	NAD	Nicotinamide adénine dinucléotide
GADH	Gluconate déshydrogénase	NIS	NRPS-independent siderophore
GB	BHm glucose sans biotite avec	NRPS	Non-ribosomal peptide synthétase
	bactéries	O	Octaèdre
GBwB	BHm glucose avec biotite avec	OD	Voie d' Oxydation Directe du glucose
	bactéries	ONF	Office National des Forêts
GDH	Glucose déshydrogénase	PCA	Phénazine acide carboxylique
gdhC	Sous-unité cytochrome de la GDH	pch	Pyochéline
gdhL	Large sous-unité de la GDH	PCN	Phénazine-1-carboxamide
		PCR	Polymerase chain reaction

Pgi	Glucose-6-phosphate isomérase	Str	Streptomycine
PGPR	Plant Growth Promoting Rhizobacteria	T	Tétraèdre
pH	Potentiel hydrogène	TAT	Système de transport twin-arginine
phz	Phénazine	TCP	Phosphate tricalcique
PIPES	Pipérazine-N,N'-bis(2- éthanesulfonique)	Tet	Tetracycline
PLS	Régression des moindres carrés	TFA	Acide trifluoroacétique
PP	Voie des Pentoses Phosphate	TSA	Tryptone soy agar
PQQ	Pyrroloquinoléine quinone	TSB	Tryptic soy broth
pvd	Pyoverdine	UFC	Unité formant colonie
Qm	Indice de saturation	Vm	Vitesse de dissolution
qPCR	PCR-quantitative	WT	Wild type
RAST	Rapid Annotations using Subsystems Technology	Zwf	Glucose-6-phosphate 1- déshydrogénase
SDH	Sorbitol déshydrogénase	α_n^j	Activité de l'agent altérant
Sm	Surface de contact	2,5KGA	2,5-keto-gluconate
Spe	Spectinomycine	2KGA	2-keto-gluconate
sPLS	Régression des moindres carrés partiels clairsemés	5KGA	5-keto-gluconate

INTRODUCTION

1. Contexte

1.1. La forêt et son écosystème, définition et bénéfices

1.1.1. La forêt

La forêt est définie comme étant un territoire occupant une superficie d'au moins 50 ares avec des arbres pouvant atteindre une hauteur supérieure à 5 m, un couvert boisé de plus de 10 % et une largeur moyenne d'au moins 20 m (Organisation pour l'alimentation et l'agriculture (FAO, 2015)). Les forêts représentent 16.9 millions d'hectares soit environ 31 % du territoire français métropolitain (Institut National de l'Information Géographique et Forestière (IGN, 2020)). Les forêts de feuillus en France métropolitaine, sont majoritaires (67 % de la superficie forestière) et elles sont constituées de diverses essences dont majoritairement le chêne et le hêtre (IGN, 2020). Les forêts peuvent être privées (75 %) ou publiques (25 %) et bénéficient d'une gestion plus ou moins intensive.

1.1.2. Les services écosystémiques¹

Les écosystèmes forestiers sont définis comme l'ensemble des organismes vivants (biocénose) et non-vivants (biotope) formant un système stable dans lequel des échanges ont lieu (Delpoux, 1972). Ils rendent des services écologiques, économiques et sociaux.

D'un point de vue environnemental, les forêts sont en général, des milieux peu anthropisés qui favorisent la biodiversité. Elles ont un rôle filtrant qui améliore la qualité des sols et des eaux. Par exemple, les arbres absorbent certains produits toxiques comme le nitrate (la forêt peut absorber jusqu'à 80% des nitrates dans les eaux de ruissellement (ONF)). En captant de grands volumes d'eau les arbres évitent l'érosion des sols et limitent les crues et glissements de terrain. De plus, la photosynthèse réalisée par les végétaux produit, à partir de CO₂ atmosphérique, du dioxygène O₂ et de la biomasse qui entraîne la séquestration du carbone atmosphérique dans la plante et dans le sol. Ce phénomène permet d'atténuer les émissions de carbone dues aux activités humaines. En effet, les forêts françaises séquestrent 15 % du total des émissions nationales de gaz à effet de serre (Office National des Forêts (ONF)).

Les services économiques rendus par la forêt sont importants en termes de production de matériaux de construction et de source d'énergie. En moyenne en France métropolitaine, 3.1 m³/ha/an de bois sont prélevés dans les forêts (IGN, 2020). A l'heure actuelle, la filière

¹ Les êtres humains tirent des bénéfices du fonctionnement de l'écosystème forestier

Tableau 0.1 : Les éléments nutritifs, leur rôle pour la plante et leur provenance traduit de (Jones and Jacobsen, 2005)

Nutriments		Rôle physiologique pour la plante	Provenance
Carbone	C	Constituant des carbohydrates Photosynthèse	Air
Hydrogène	H	Equilibre osmotique Réactions biochimiques Constituant des carbohydrates	Eau
Oxygène	O	Constituant des carbohydrates Respiration	Air/Eau
Azote	N	Constituants des protéines, de la chlorophylle et des acides nucléiques	Air/Sol
Phosphore	P	Constituants des protéines, coenzymes, acides nucléiques Transfert d'énergie	Sol
Potassium	K	Photosynthèse Transport des carbohydrates Synthèse de protéines	Sol
Calcium	Ca	Composé de la paroi cellulaire Structure et la perméabilité des membranes	Sol
Magnésium	Mg	Activité enzymatique Composant de la chlorophylle	Sol
Souffre	S	Présent dans certaines protéines	Sol
Boron	B	Transport des sucres Métabolisme des carbohydrates	Sol
Chlore	Cl	Photosynthèse	Sol
Cuivre	Cu	Catalyseur de la respiration Composé de certaines enzymes	Sol
Fer	Fe	Synthèse de la chlorophylle Activité enzymatique par transfert d'électron	Sol
Manganèse	Mn	Réactions d'oxydo-réduction Photosynthèse	Sol
Molybdène	Mo	Fixation de l'azote Transformation du nitrate en ammonium	Sol
Nickel	Ni	Fonctionnement de certaines enzymes (uréase) Germination	Sol
Zinc	Zn	Régulation d'activités métaboliques	Sol

bois représente un chiffre d'affaires annuel de 60 milliards d'euros en France (ONF). Matériau écologique, le bois est la première source d'énergie renouvelable en Europe (ONF). Enfin, la forêt a un rôle récréatif, c'est un lieu de culture et de loisirs où ont lieu la pratique de certains sports (course à pied, VTT, équitation...) mais aussi de l'écotourisme.

Dans le contexte de changements climatiques où la population et l'urbanisation sont croissantes et où la demande en ces services est de plus en plus importante, les forêts sont soumises à une forte pression. Développer notre compréhension du fonctionnement de l'écosystème forestier permet d'envisager une gestion responsable et durable² de celui-ci.

1.2. Les particularités de l'écosystème forestier

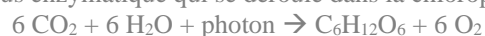
1.2.1. Les arbres et leurs besoins nutritifs

Toutes les plantes ont plus ou moins les mêmes besoins nutritifs (soleil, eau, nutriments). Cependant, contrairement aux plantes annuelles, les arbres se singularisent par leur durée de vie. L'écosystème forestier doit donc soutenir la croissance des arbres sur parfois plusieurs siècles (jusqu'à 200 ans pour le hêtre et 500 ans pour le chêne). Leur croissance est dépendante des nutriments que l'arbre est capable d'acquérir ou de synthétiser. Ces nutriments sont la base des processus physiologiques et des structures biologiques des arbres (Tableau 0.1 (Cole and Gessel, 1992)). Par exemple, le rôle du potassium dans la résistance aux stress biotiques et abiotiques a été démontré (Wang *et al.*, 2013). A l'heure actuelle, pour les espèces d'arbres majoritaires des forêts tempérées, des carences en P sont observées (Jonard *et al.*, 2015).

Le carbone (C) issu de la photosynthèse³ est le constituant majeur de la matière organique⁴. Les autres nutriments importants sont l'azote (N), le phosphore (P) et les cations nutritifs : le

² La gestion durable des forêts a été définie lors de la conférence ministérielle à Helsinki en 1993 comme suit : « la gestion et l'utilisation des forêts et des terrains boisés d'une manière et à une intensité telles qu'elles maintiennent leur diversité biologique, leur productivité leur capacité de régénération, leur vitalité et leur capacité à satisfaire, aujourd'hui et pour le futur les fonctions écologiques, économiques et sociales pertinentes aux niveaux local national et mondial, telles qu'elles ne causent pas de préjudices à d'autres écosystèmes » (Barthod and Touzet, 1994).

³ La photosynthèse est un processus enzymatique qui se déroule dans la chlorophylle suivant la réaction :



⁴ La matière organique peut provenir des plantes, des animaux et des microorganismes. Elle peut être vivante ou morte et à des stades de décompositions et transformations plus ou moins avancés (Swift, 1996). D'un point de vue chimique, la matière organique est composée principalement de carbone, d'hydrogène, d'oxygène et d'azote mais elle contient également d'autres éléments comme le phosphate, le potassium et le calcium...

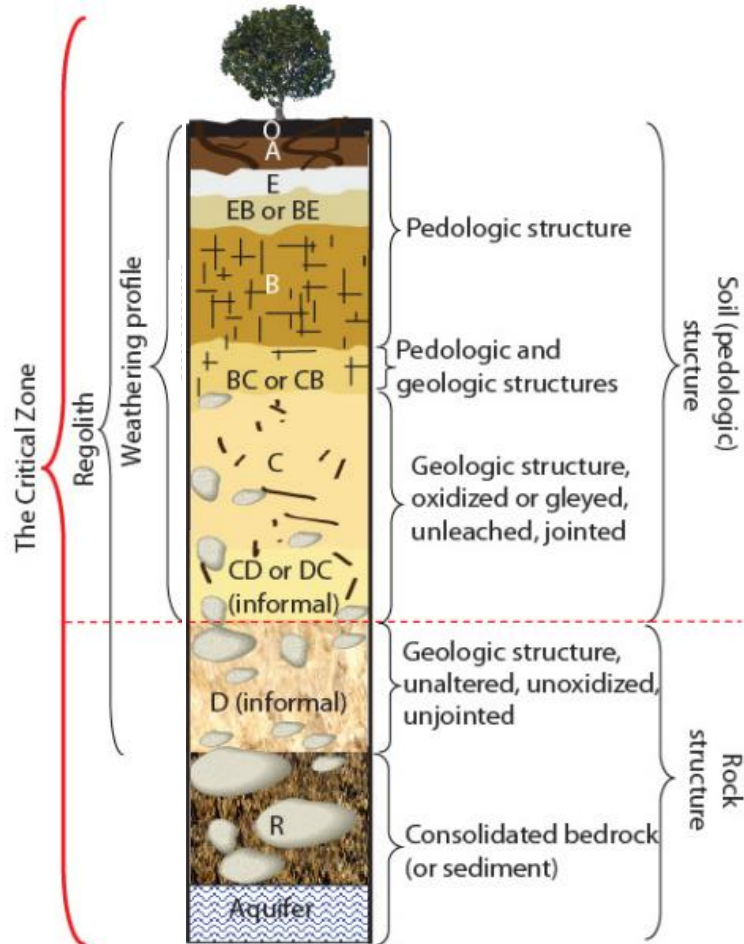


Figure 0.1 : Représentation schématique de la zone critique incluant le régolithe et le profil d'altération (Lin, 2010)

Les minéraux et roches forment un gradient depuis la roche mère à la surface du sol appelé régolithe. Les minéraux les plus grossiers sont au contact de la roche mère du fait de sa fragmentation, à l'inverse les minéraux les plus fins se retrouvent à la surface. Cette distribution dépend du type de sol et de son épaisseur.

La zone critique est un concept encore plus large allant du sommet de l'arbre (canopée) au fond de l'aquifère.

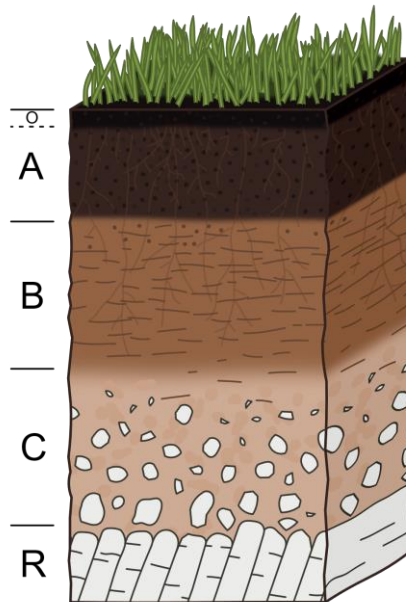


Figure 0.2 : Les différents horizons d'un sol

L'horizon O est composé de la litière et de l'humus, il compose la matière organique pas ou peu dégradée (débris végétaux...) les premières étapes de la décomposition de la matière organique se déroulent dans cette couche.

L'horizon A est la couche organo-minérale du sol, elle contient de la matière organique en cours de décomposition et de la matière minérale, des complexes argilo-humiques sont formés. Les processus d'humification et de minéralisation ont lieu dans cet horizon. Les nutriments issus de la minéralisation se fixent sur le complexe argilo-humique (formant la CEC) ou sont entraînés dans les horizons plus profonds par les eaux de pluies (lessivage).

L'horizon B est appelé horizon minéral, il est pauvre en matière organique et enrichi en matière minérale (oxyhydroxydes de fer, carbonates, silicates), les minéraux présents sont issus de la néoformation (précipitation des éléments chimique en solution) ou des minéraux primaires provenant des horizons inférieurs.

potassium (K), le calcium (Ca), le magnésium (Mg)... Ces nutriments sont puisés dans la solution de sol par les racines (Tableau 0.1 (Jones and Jacobsen, 2005)). Cependant ces nutriments doivent être bioaccessibles c'est-à-dire sous forme d'ions dans la solution de sol. L'accessibilité des nutriments dépend donc de la capacité du sol à stocker et libérer les ions en solution. En fonction des caractéristiques édaphiques⁵ du sol, sa capacité à fournir les éléments nutritifs nécessaires au développement des arbres varie.

1.2.2. Le sol des forêts tempérées

1.2.2.1. Le sol

La zone critique de la Terre s'étend de la canopée aux aquifères⁶, cette région hétérogène de la Terre englobe différentes zones dont le sol (Lin, 2010) (Figure 0.1). Verticalement, le volume du sol s'étend de la surface de la terre jusqu'à la roche altérée (GIS Sol, 2011). Le sol est la couche superficielle des surfaces continentales, formé sur des dizaines de millénaires par l'altération de la roche mère puis par l'accumulation de matière organique provenant de la flore principalement et de la faune (Bruand, 2009). Le sol est organisé en plusieurs couches aux propriétés différentes appelées horizons (Figure 0.2). Le sol est composé de différents constituants dont la proportion varie en fonction du type de sol. On distingue :

- le solide composé de matière organique et minérale en proportions variables
- le liquide constitué de la solution de sol où les éléments minéraux sont en solution sous forme d'ions
- le gazeux situé dans les pores du sol.

1.2.2.2. Singularités des sols forestiers

De nos jours, les sols forestiers européens se singularisent des sols agricoles pour des raisons historiques d'usage. En effet, l'Homme s'est installé sur les terres les plus fertiles⁷, les mieux drainées et situées sur les reliefs les moins accidentés laissant à l'état de forêt les sols aux propriétés physico-chimiques et hydriques défavorables aux activités agricoles (Ranger, 2001). Des vestiges gallo-romains datés entre 10 et 180 après JC ont été retrouvés dans la forêt des

⁵ Les caractéristiques édaphiques d'un sol sont les caractéristiques physiques et chimiques du sol incluant également la texture, la structure, la porosité, la teneur en eau, l'acidité et la teneur en nutriments du sol.

⁶ Un aquifère est un sol ou une roche réservoir originellement poreuse ou fissurée, contenant une nappe d'eau souterraine et suffisamment perméable pour que l'eau puisse y circuler librement.

⁷ La fertilité est l'aptitude des sols à apporter les éléments essentiels à la croissance des végétaux.

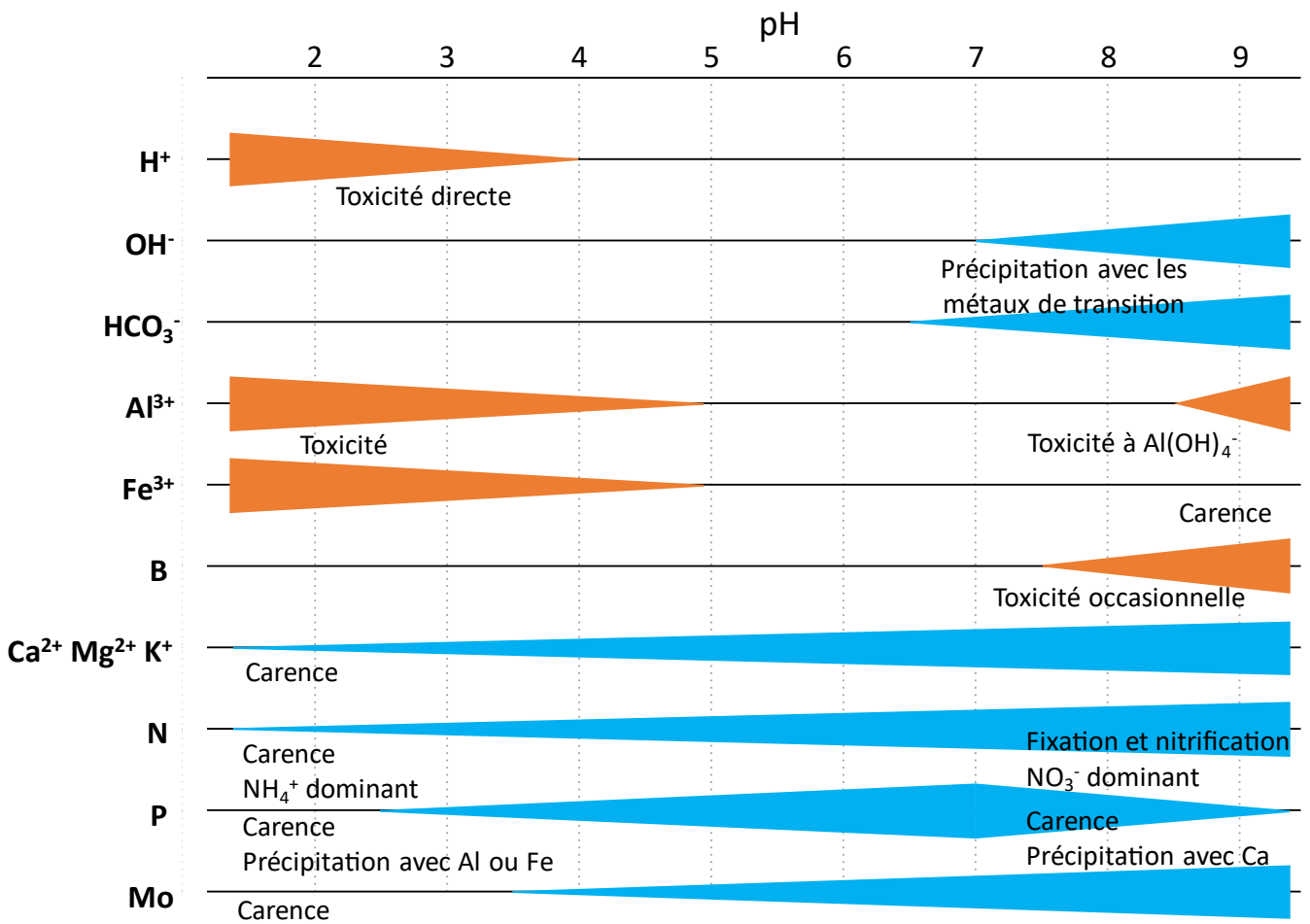


Figure 0.3 : Solubilités des ions en fonction du pH (Gobat *et al.* 1998)

La baisse ou l'augmentation du pH (surtout dans les extrêmes) met en solution de nombreux ions, notamment des métaux qui peuvent s'avérer toxiques pour les plantes.

Vosges en Alsace démontrant que la forêt s'est développée sur des zones exploitées par l'homme pour l'agriculture et l'établissement de villages ou zones d'habitation (site d'Oedenburg, (Girardclos and Petit, 2011)). En France, la surface forestière de 8.9 millions d'ha au début du 19^{ème} siècle a augmenté pour atteindre 16.9 millions d'ha en 2019 (IGN, 2020). Il existe donc à l'heure actuelle des forêts construites sur des anciens sols agricoles (Koerner *et al.*, 1999).

En général, les sols forestiers dans les régions tempérées sont plus acides et plus pauvres en éléments nutritifs que les sols agricoles. Par exemple, 12% des sols agricoles sont acides (pH < 5,5) contre 62 % des sols forestiers (Badeau and Dambrine, 1999). Cette acidité n'est pas anodine car elle peut entraîner une perte de fertilité (voir ci-après) ou une toxicité à l'aluminium (Ranger, 2001).

1.2.2.3. Caractéristiques chimiques

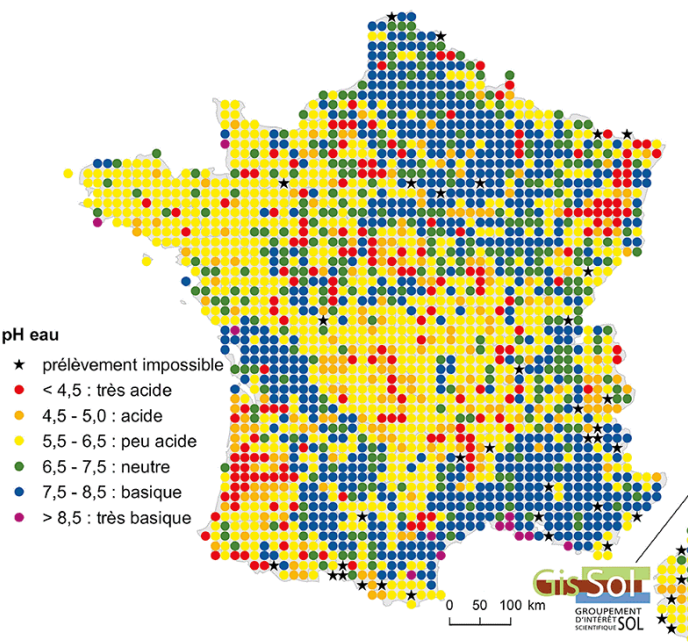
Capacité d'échange cationique

Les argiles et les matières organiques du sol (complexe argilo-humique) sont généralement chargés négativement et constituent les supports pour les cations dits « échangeables » (Chapman, 1965). La capacité d'échange cationique (CEC : somme des cations échangeables exprimée en cmol^+/kg) représente le potentiel d'un sol à retenir ces cations : Ca^{2+} , Mg^{2+} , K^+ , Na^+ , H^+ , Al^{3+} ... Ces cations sont dits soit acides, soit basiques. L'acidité d'échange (AE) est la somme des cations acides (*i.e.*, H^+ et Al^{3+}) échangeables dans un sol (Thomas, 1982). Dans les sols acides, la proportion de la CEC occupée par l'acidité d'échange est élevée.

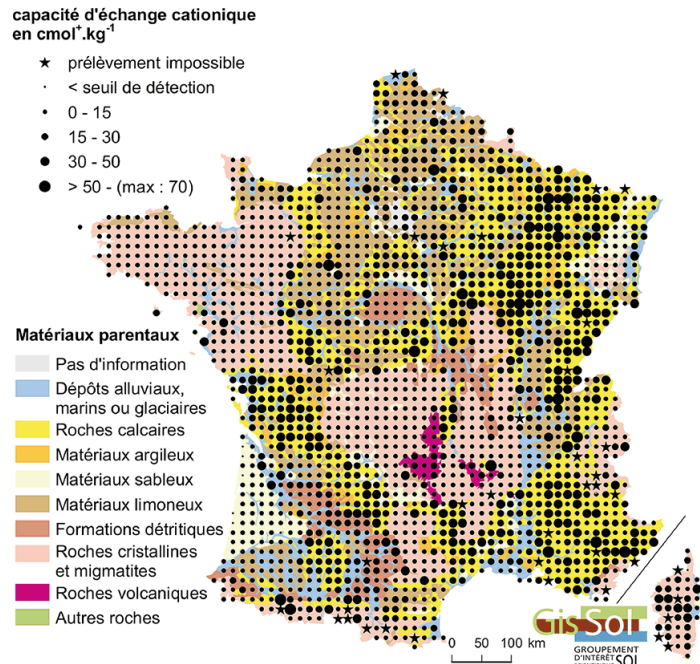
Les cations sont dits échangeables car des échanges permanents se réalisent entre les sites d'échange (CEC) et la solution de sol. De ce fait, le contenu chimique de la solution de sol est directement en lien avec la quantité de cations échangeables. Ils sont d'ailleurs facilement accessibles pour les plantes.

On distingue la CEC (imaginée comme la grandeur de la « boîte CEC ») de la concentration ou taux d'un élément échangeable (imaginé comme le contenu de la « boîte CEC »). Par exemple, le taux de saturation est la somme des cations basiques échangeables rapporté à la CEC du sol. La mesure de la CEC et du taux de saturation sont un bon indicateur de la fertilité chimique d'un sol. Plus la CEC est élevée, et le rapport AE/CEC faible, plus la fertilité d'un sol est importante.

A Le pH eau des horizons de surface (0-30 cm) des sols en France



B La capacité d'échange cationique des horizons de surface (0-30 cm) des sols de France



C Taux de boisement en France

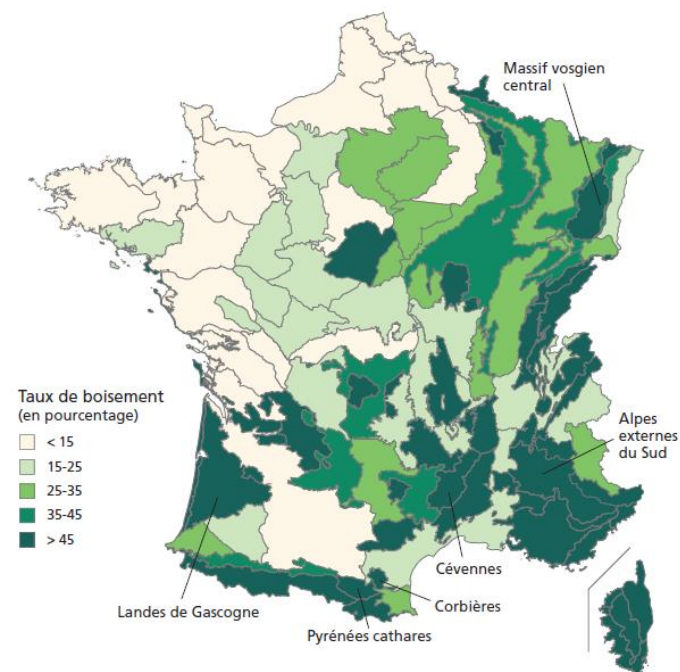


Figure 0.4 : Distribution du pH et de la CEC des sols de France ainsi que le taux de boisement (source : GIS Sol ; IGN)

La comparaison du taux de boisement (C) avec le pH (A) et la CEC (B) des sols en France permet d'observer que les forêts sont principalement développées sur des sols acides ou basiques (dans le cas des Alpes) avec une CEC faible (sauf pour les Alpes).

Le pH et ses effets sur le sol

Le pH du sol est le logarithme de l'activité des protons (H^+)⁸. Le pH affecte de nombreux processus chimiques dans le sol et notamment la disponibilité en nutriments. En effet, il agit sur la proportion des cations échangeables acides et sur la grandeur de la CEC.

Dans les sols acides, l'acidité d'échange (AE) est élevée, c'est-à-dire que les protons et l'aluminium occupent une place importante de la CEC au détriment des autres cations dits basiques (K^+ , Ca^{2+} , Mg^{2+} ...) (Bonneau, 1989). A pH acide, ce sont des éléments chimiques tels que l'aluminium (Al^{3+}) et le fer (Fe^{3+}) qui sont libérés dans la solution du sol. Notamment, l'ion Al^{3+} peut conduire à une toxicité. Au contraire, les cations basiques (Ca^{2+} , Mg^{2+} ...) sont plutôt libérés à des pH neutres voire basiques (Figure 0.3) (Gobat *et al.*, 1998).

De plus, les charges d'un sol (CEC) sont de deux types : les charges fixes (liées à des substitutions⁹ dans les argiles et non sensibles au pH de la solution) et les charges variables (charges de surface des matières organiques et des minéraux dépendantes du pH de la solution). A pH acide, les charges variables diminuent. Ceci se traduit par des CEC de sol acide souvent bien plus faible que dans les sols neutres.

En France, les sols forestiers sont majoritairement acides (Figure 0.4A) et présentent une CEC faible entre 0 et 15 $cmol^+/kg$ (Figure 0.4B). Par exemple, ils comportent des teneurs en ions échangeables très faibles pour le magnésium, le potassium (entre 0.02 et 0.5 $cmol^+/kg$), et le calcium ($< 0.1 cmol^+/kg$) (GIS Sol, 2011).

1.2.2.4. Caractéristiques physiques du sol et conséquences sur l'arbre

L'épaisseur du sol

Les arbres ne sont pas tous développés sur des sols équivalents en termes d'épaisseur. Cette épaisseur qui correspond à la distance entre la roche mère et la surface, définit la zone de sol directement accessible aux racines des arbres. Elle est déterminée par différents phénomènes de pédogénèse tels que l'altération de la roche, le dépôt de matières (matière organique ou dépôt atmosphérique) ou l'érosion (Phillips, 2010). Cette épaisseur joue deux rôles importants pour les arbres : un rôle d'ancrage et un rôle nutritif (en eau et nutriments).

⁸ $-\log[H^+]$

⁹ Remplacement d'un cation par un autre, pour les argiles, le plus souvent au niveau de l'espace interfoliaire. Si cet échange se fait entre deux ions qui n'ont pas le même nombre de charges, un déséquilibre apparaît qui est compensé par la fixation à la surface d'ions « compensateurs » à l'origine de la capacité d'échange du minéral (Meunier, 2005).



Figure 0.5 : Visualisation d'arbres dont les racines se sont développées sur un sol peu profond

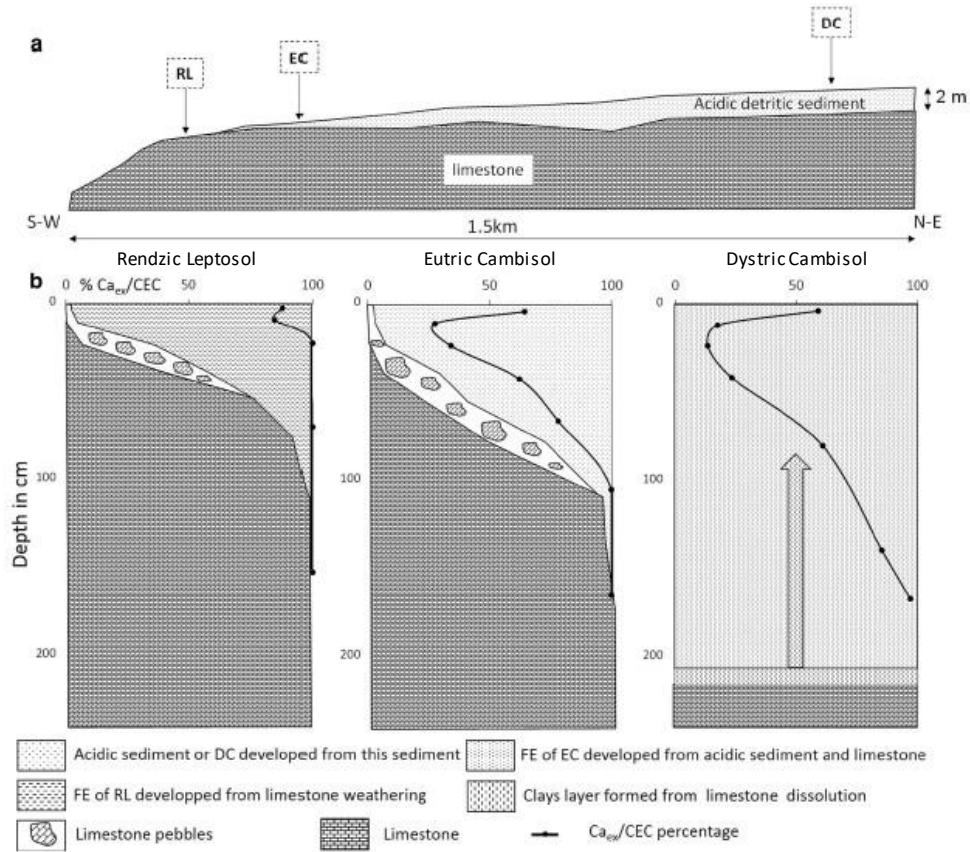


Figure 0.6 : Géologie de la forêt expérimentale de hêtre de Montiers (Turpault *et al.* 2019)

(a) La toposéquence naturelle de 1.5 km de long va d'un sol superficiel à un sol profond. (b) Les différents profils de sol permettent de voir l'évolution de la CEC et la minéralogie en fonction de la profondeur.

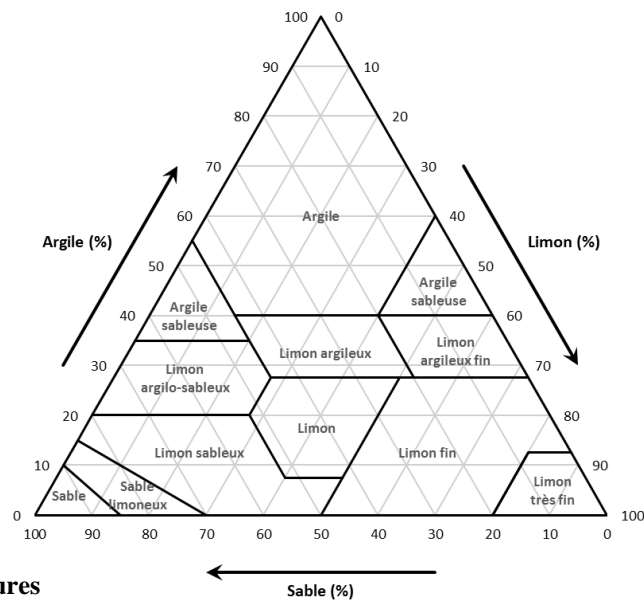


Figure 0.7 : Le triangle des textures

Le triangle des textures permet d'évaluer la texture d'un sol en prenant un compte sa composition en argile, limon et sable.

En effet, le sol est un support physique pour l'établissement des végétaux. Sans le développement du système racinaire, les arbres ne pourraient se maintenir à la verticale. Un sol superficiel limite donc le développement des racines car directement en contact avec la roche mère. L'illustration de ce problème s'observe facilement sur les arbres développés sur des coteaux ou en montagne (Figure 0.5). A l'inverse un sol profond permet un bon ancrage des racines qui vont s'infiltrer à travers les différents horizons (Nicolitch *et al.*, 2017).

Les propriétés du sol varient en fonction de sa profondeur. L'horizon de surface est plutôt riche en matières organiques et a une CEC élevée tandis que les horizons plus profonds sont plus pauvres en matières organiques avec une CEC plus faible. A l'inverse les pH les plus faibles sont observés en surface. La somme des stocks des cations échangeables de chaque horizon détermine le réservoir total du sol en cations échangeables. Par conséquent, l'épaisseur du sol est un facteur important à considérer vis-à-vis de la fertilité.

De manière notable, cette épaisseur peut grandement varier, même à des échelles locales. Le site expérimental de Montiers en est un très bon exemple (Figure 0.6) (Turpault *et al.*, 2019). Cette forêt de hêtres est caractérisée par une toposéquence naturelle de 2 km de long allant d'un sol profond (plusieurs mètres) avec une faible disponibilité en nutriments et un pH acide, à un sol superficiel (environ 20 cm) avec une disponibilité élevée en nutriments et un pH neutre. Néanmoins si on considère quantitativement l'ensemble du profil de sol, le sol superficiel du fait de sa faible épaisseur ne peut fournir qu'une faible quantité de nutriments aux arbres comparativement aux sols profonds. Il est donc important de prendre en compte l'épaisseur du sol pour déterminer son contenu nutritif.

La texture

La texture du sol (terre fine < 2 mm) est déterminée par la composition granulométrique (distribution en taille des éléments solides du sol) des minéraux et roches qui le composent. On considère trois grandes classes : le sable (2 - 0.05 mm), le limon (0.05 - 0.002 mm) et les argiles (< 0.002 mm) (Bruand, 2009). En fonction de la quantité de chacun, la texture du sol est évaluée à l'aide du triangle des textures (figure 0.7). La texture joue un rôle important dans le développement et la nutrition des plantes car elle influence la capacité à retenir l'eau et les nutriments. Par exemple, le sable est poreux et a une faible surface de contact, de ce fait il a une faible capacité à retenir l'eau et les nutriments contrairement aux argiles qui ont une surface de

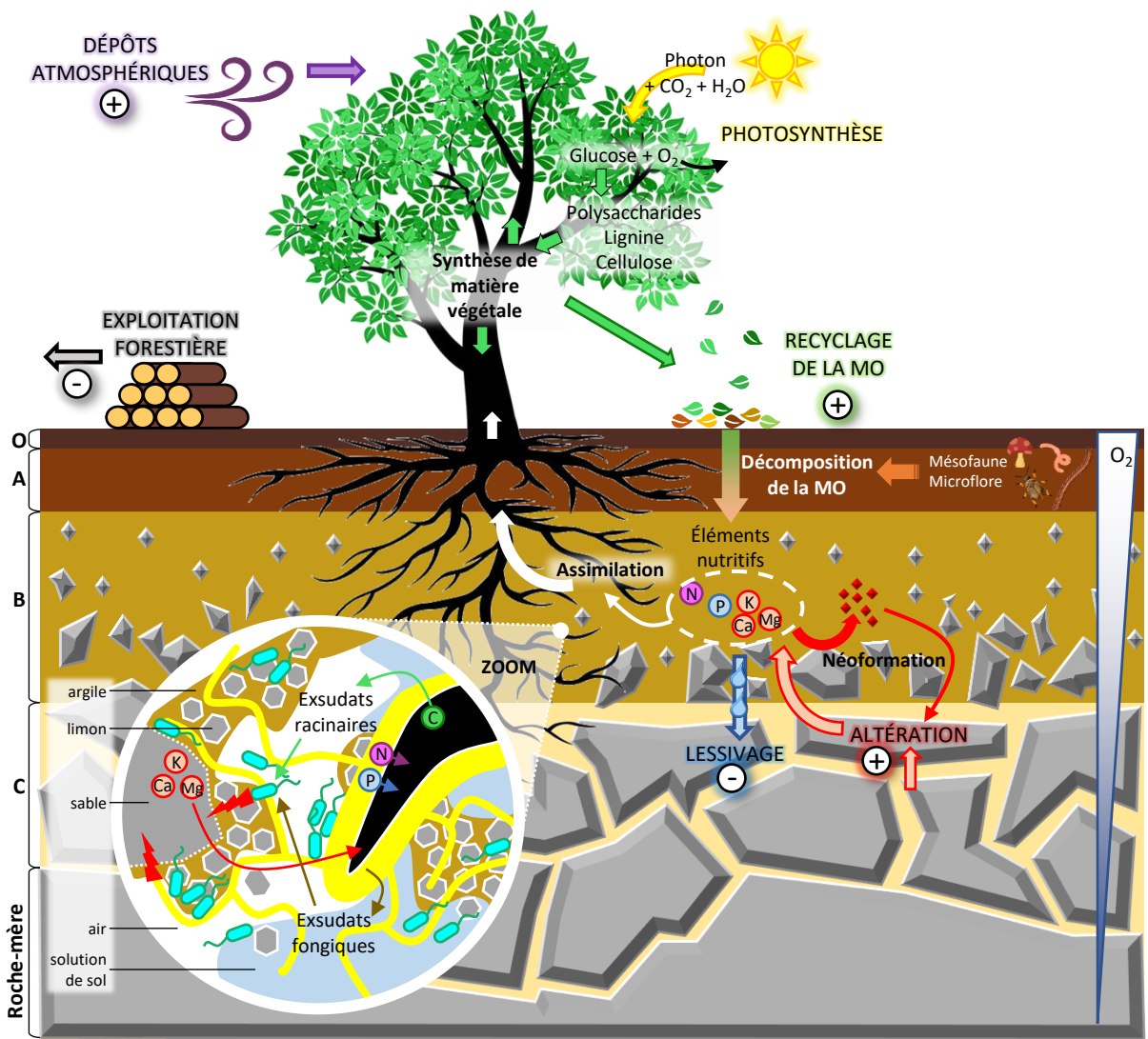


Figure 0.8 : L'écosystème forestier et la provenance des nutriments

L'arbre synthétise sa propre matière organique (MO) *via* la photosynthèse (jaune). La matière organique est ensuite recyclée (vert) : le feuillage (perte en automne) et les débris végétaux (bois, racine mortes...) sont décomposés par la mésofaune et la microflore et fournit les nutriments au sol (minéralisation) qui seront réabsorbés par les racines. Les dépôts atmosphériques (violet) fournissent un apport externe de nutriments. L'altération des roches et minéraux (rouge) du sol biotique ou abiotique relargue des nutriments inorganiques (K, Mg, Ca, P). Lorsque la solution de sol est saturée en éléments chimiques des précipitations peuvent avoir lieu, c'est la néoformation de minéraux secondaires.

L'écosystème forestier subit des pertes de nutriments suite à l'exploitation des forêts (gris) par l'Homme (prélèvement de bois, essartage, soutrage...). De plus, les ions solubles dans la solution de sol peuvent être emportés par les eaux, c'est le lessivage (bleu).

ZOOM représentation de la mycorrhizosphère : Les champignons (jaune) forment des mycorrhizes avec les racines des arbres (noir). Les hyphes prospectent le sol environnant à la recherche de nutriments qu'ils fournissent ensuite à la plante (N et P principalement) en échange de carbone. Les racines et les champignons produisent des exsudats, ils sont utilisés par les bactéries environnantes. Les bactéries et les champignons altèrent les minéraux et roches par action physique ou chimique (éclair rouge) relarguant ainsi des nutriments qui deviennent accessibles pour les plantes.

contact plus élevée et sont plus réactifs (présence de charges négatives) (Gobat *et al.*, 1998; Jones and Jacobsen, 2005).

La structure

La structure du sol est un mode d'assemblage de ses constituants solides formant ou non des agrégats (Gobat *et al.*, 1998). Elle dépend de la texture, du taux d'humidité et de la matière organique. En fonction de la structure du sol, la rétention d'eau est plus ou moins importante, elle influe aussi sur l'enracinement des plantes (Tardieu and Manichon, 1987).

La porosité

La porosité du sol est le volume des vides occupés par l'eau ou l'air (ou d'autres gaz). Elle permet de fournir l'oxygène nécessaire aux organismes aérobies (conditions oxiques) dans le sol. La porosité influence également la circulation de l'eau.

1.3. La provenance des nutriments

Les nutriments utilisés par les plantes pour assurer leur croissance proviennent du fonctionnement interne de l'écosystème forestier (recyclage des éléments ; stockage facilement accessible sur la capacité d'échange cationique...) ou bien d'apports extérieurs (dépôts atmosphériques, altération des minéraux...) (Figure 0.8). L'équilibre nutritif de l'écosystème forestier est menacé par la réduction d'entrées ou des dysfonctionnements internes entraînant des pertes/baisses de nutriments liés à des phénomènes naturels (sécheresse, pluies acides...) ou bien anthropiques (récolte intensive, tassement du sol...), surtout dans les forêts exploitées (Ranger and Turpault, 1999).

1.3.1. Les apports internes : la décomposition de la matière organique

Les nutriments absorbés par les arbres proviennent principalement du recyclage de la matière organique. Cette matière organique est issue des plantes (racine, litière, bois mort) et de la mésofaune¹⁰ et microflore¹¹. Elle est constituée à 99 % de C, H, O, N, P, S, Ca, Mg, Cl, Na et est organisée sous différentes formes de composés tels que les glucides, lignines, lipides et

¹⁰ Mésofaune : constituée de la macrofaune et de la microfaune.

¹¹ Microflore : champignons, algues et bactéries.

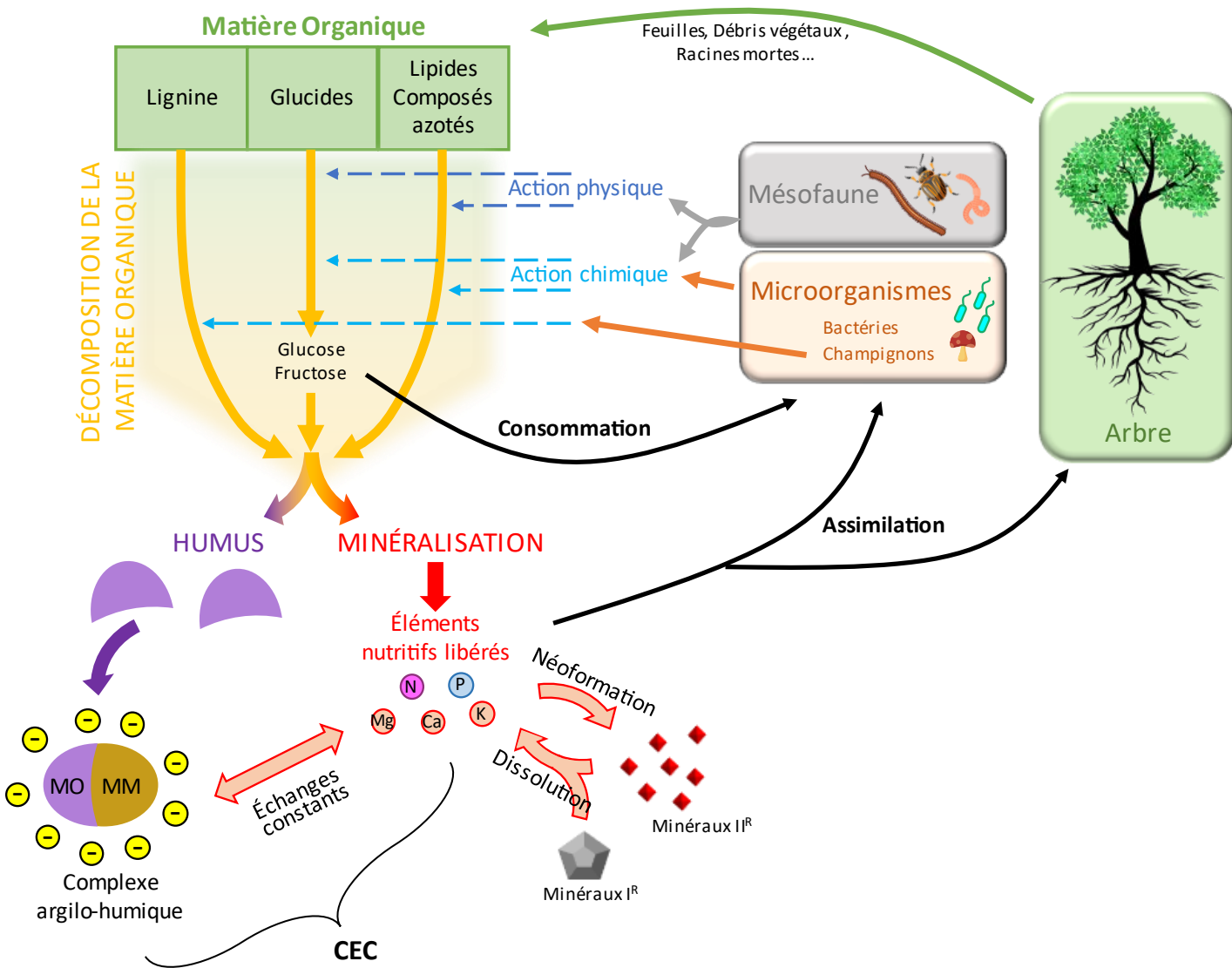


Figure 0.9 : Le recyclage de la matière organique

La matière organique (MO) composée majoritairement de lignine, glucides, lipides et composés azotés est fournie par les arbres (feuilles, débris végétaux, racines mortes...) au sol. La décomposition de la MO est réalisée par la mésosfaune et les microorganismes du sol par action physique (fragmentation) ou chimique (enzymes digestives, sécrétion de molécules...). La MO subit différentes étapes successives de décomposition jusqu'à :

- (i) La formation de humus. Le humus peut se fixer aux argiles du sol formant le complexe argilo-humique, de manière générale ce sont les matières organique (MO) et minérale (MM) qui présentent des charges négatives à leur surface et constituent la CEC du sol.
- (ii) La libération des éléments chimiques en solution (minéralisation), ils sont alors accessibles pour les arbres et microorganismes qui les consomment. Lorsque la solution de sol est saturée, certains éléments chimiques peuvent précipiter (néoformation) formant des minéraux secondaires. Les cations produits par la minéralisation peuvent également se fixer sur le complexe argilo-humique déterminant la CEC d'un sol.

composés azotés qui varient en fonction de leur origine (Gobat *et al.*, 1998). Le contenu de la matière organique d'origine végétale est restitué dans les sols suite à la perte du feuillage et des débris végétaux constituant la litière aérienne mais aussi au niveau souterrain (racines mortes ou exsudats racinaires).

Cette matière organique subit des phases successives de fragmentation et de décomposition réalisées par la macrofaune¹², la microfaune¹³ et la microflore (Figure 0.9) (Ovington, 1962). Ces différents organismes se succèdent dans ce processus de décomposition aboutissant à : (i) la formation de l'humus¹⁴, (ii) la migration de la matière organique dans le sol qui se lie aux argiles pour former le complexe argilo-humique (Cornejo and Hermosín, 1996) et (iii) la minéralisation définie comme la décomposition de la matière organique jusqu'à la libération des éléments chimiques qui la composent. Les éléments chimiques tels que N, P, Ca, Mg, K... se retrouvent dans la solution de sol et peuvent être puisés par les organismes environnants dont les végétaux bouclant alors le recyclage de la matière organique. Néanmoins, la décomposition de la matière organique est plus ou moins rapide en fonction du type de composé dégradé. Par exemple, la cellulose et l'hémicellulose sont dégradées rapidement et transformées en sucres simples tels que le glucose et le fructose. Ces derniers sont consommés par les microorganismes du sol (champignons et bactéries). A l'inverse, les composés tels que la lignine sont plus difficiles à dégrader, seuls certains champignons (champignon à pourriture blanche) sont capables de la décomposer entièrement (Reid, 1995).

1.3.2. Les apports extérieurs

1.3.2.1. Les dépôts atmosphériques

L'écosystème forestier, tout comme les autres écosystèmes, reçoit une part non négligeable de nutriments sous forme de poussières, particules plus petites ou dissoutes. Ils sont transportés par le vent, les pluies, le brouillard et plus localement les aérosols. Les sources d'émission sont multiples, mais on pourra noter les embruns marins et l'érosion terrestre parmi les sources naturelles et les feux de cheminée, les combustions industrielles, les labours parmi les sources anthropiques. Quantitativement les dépôts atmosphériques peuvent contribuer jusqu'à 30% des apports totaux de nutriments de l'écosystème, augmentant considérablement les bilans

¹² Macrofaune : animaux de taille supérieure à 0.2 mm vivant dans les sols (ex : vers de terre, fourmis, arachnides, enchytréides, termites, crustacés...).

¹³ Microfaune : animaux dont la taille est inférieure à 0.2 mm (ex : protozoaires, tardigrades, rotifères).

¹⁴ Humus : matière organique à différents stades de décomposition qui se trouve au niveau de la couche holorganique du sol

nutritionnels des forêts (Lequy *et al.*, 2012). Récemment, il a été démontré que la forêt amazonienne recevait des nutriments *via* les dépôts atmosphériques provenant de différentes régions du globe (les Andes, l’Afrique du Nord (désert du Sahara) ou l’Afrique du Sud) (Nogueira *et al.*, 2021).

1.3.2.2. L’altération des minéraux

L’altération des minéraux est définie comme un processus menant à la dissolution, la fragmentation ou à la transformation d’un minéral. Elle permet de libérer en solution les éléments chimiques et notamment les cations nutritifs (K, Mg, Ca...) et le phosphore (P) emprisonnés dans la structure cristalline des minéraux. Les nutriments ainsi libérés sont alors biodisponibles pour les organismes vivants tels que les arbres. Cependant la qualité et la quantité de nutriments apportés par l’altération des minéraux sont dépendantes de la composition chimique des minéraux ainsi que leur nombre.

Les différents processus impliqués dans l’altération ainsi que les différents types de minéraux seront abordés dans la deuxième partie de cette introduction (§2).

*La quantité et la fréquence des dépôts atmosphériques sont liées aux conditions climatiques, ces apports sont donc fortement variables d’une année sur l’autre. Par conséquent, la fertilité à long terme des sols forestiers dépend principalement du recyclage des éléments contenus dans la matière organique et de la capacité des minéraux à alimenter le sol en nutriments biodisponibles (Fichter *et al.*, 1998).*

1.3.3. Les pertes de nutriments inorganiques et perturbations

1.3.3.1. Le lessivage

Le lessivage est la mise en solution de composés hydrosolubles. Lors des pluies, ces composés sont drainés par les eaux de pluie jusque dans les couches les plus profondes du sol (aquifères) et/ou jusque dans les cours d’eau (pour un terrain en pente) (Blanco *et al.*, 2005; Augusto *et al.*, 2000b). Ce phénomène représente une perte d’éléments nutritifs pour l’écosystème. Ces pertes de nutriments sont aggravées par les pluies acides survenues principalement à cause de l’émission de gaz polluants industriels (Levy, 1995). En plus d’un apport d’eau qui draine le

sol, l'acidité de ces pluies entraînent une perte de cations nutritifs (Bonneau, 1985, 1989). Cela a été démontré sur la forêt expérimentale de Hubbard Brook aux Etats-Unis où des pluies acides ont eu lieu en 1900 et 1973 (suite à l'émission de gaz polluants dus aux activités humaines (Program (U.S.), 1993)). En conséquence, en 1982 la quantité de calcium Ca^{2+} perdue par drainage des eaux avait augmenté diminuant les réserves nécessaires au maintien de la croissance des arbres (Tomlinson, 2003).

1.3.3.2. L'implication de l'Homme

Historique de l'exploitation des forêts en Europe

De tout temps, les forêts ont été exploitées pour la production de combustible, le bois de construction, la cueillette, le pâturage et le développement de nouvelles parcelles exploitables pour l'agriculture. Les premières traces de l'exploitation des forêts européennes remontent à l'époque pré-romaine (Perlin, 2005). La déforestation et l'exploitation intensive de la forêt a conduit en 1850 à la réduction de la superficie forestière la plus importante jamais atteinte en Europe (McGrath *et al.*, 2015).

A partir du 18^{ème} siècle, les premières écoles forestières ont vu le jour en Allemagne, Autriche et France, signant le début d'une gestion de l'exploitation forestière (Farrell *et al.*, 2000). Au cours du 18 et 19^{ème} siècle, de nouvelles pratiques de gestion des ressources forestières ont été développées telles que la récolte des litières pour fertiliser les sols agricoles (Tessier, 1910; Ranger and Nys, 2003; Augusto *et al.*, 2000a). La période d'après-guerre a vu l'apparition de la mécanisation de l'agriculture et de la sylviculture. L'utilisation de lourdes machines en forêt a entraîné une augmentation du prélèvement de bois mais aussi un tassement du sol, modifiant ses propriétés et ayant des conséquences sur les communautés microbiennes et la physiologie des plantes présentes (acquisition d'eau et photosynthèse réduites) (M. Hartmann *et al.*, 2014; Mariotti *et al.*, 2020).

Ces différentes étapes de l'histoire ont permis de mettre en évidence qu'un prélèvement non raisonné de la biomasse végétale entraîne une perte non négligeable de nutriments pour l'écosystème, conduisant à une diminution de la fertilité du sol et à long terme, une diminution de la croissance des arbres et donc de la production forestière (Ranger *et al.*, 1995; Olsson *et al.*, 1996; Brêthes, 2012; Ponder *et al.*, 2012).

Les forêts : des environnements en général pas ou peu amendés

L'impact de l'exploitation forestière par l'Homme est d'autant plus important du fait que les sols forestiers ne sont généralement pas ou peu amendés. Les forêts sont donc considérées comme des écosystèmes à faibles intrants. L'accès aux éléments nutritifs et le recyclage y sont des processus essentiels. Certains sites expérimentaux (Ardennes, Vosges, Normandie) ont fait l'objet d'amendement calco-magnésien ce qui a eu pour effet d'améliorer la qualité des sols et ainsi la nutrition des arbres sur le long terme (Brêthes, 2012). D'autres forêts en Suède et en Finlande sont fertilisées (apport d'azote). Néanmoins, les pratiques de fertilisation et d'amendement des forêts restent anecdotiques par rapport au nombre de forêts exploitées.

Les arbres dépendent d'un apport en nutriment sur plusieurs siècles pour assurer leur développement et leur santé. Le fonctionnement de l'écosystème forestier est en équilibre constant entre pertes et apports de nutriments. Cependant, l'intervention de l'Homme (exploitation forestière...) tend à perturber cet équilibre (homéostasie). Les apports internes et externes permettront-ils de maintenir le fonctionnement de ces écosystèmes ? Dans ce contexte, l'altération des minéraux est une source non négligeable de nutriments pour maintenir la croissance des arbres.

2. Les minéraux et leur altération

2.1. Roches et minéraux : description et caractéristiques

La roche mère correspond à la couche superficielle de la croûte terrestre située en dessous de la couche de sol (Figure 0.1 et 0.2). Elle est composée de différentes roches dont l'assemblage dépend de sa formation (magmatique, métamorphique ou sédimentaire). On pourra citer pour exemple le granite (magmatique), le schiste (métamorphique) ou le calcaire (sédimentaire). La roche est en général constituée de différents minéraux qui se sont agrégés de manière plus ou moins ordonnée, ce qui en fait un matériel hétérogène. Par exemple, le granite contient en général différents types de minéraux tels que le quartz, le feldspath potassique, le plagioclase, des micas (biotite, muscovite) et l'apatite. Les minéraux ont une composition chimique spécifique. Un minéral est également défini par sa structure solide, son organisation et sa formation. Deux grandes catégories de minéraux dans les sols se distinguent :

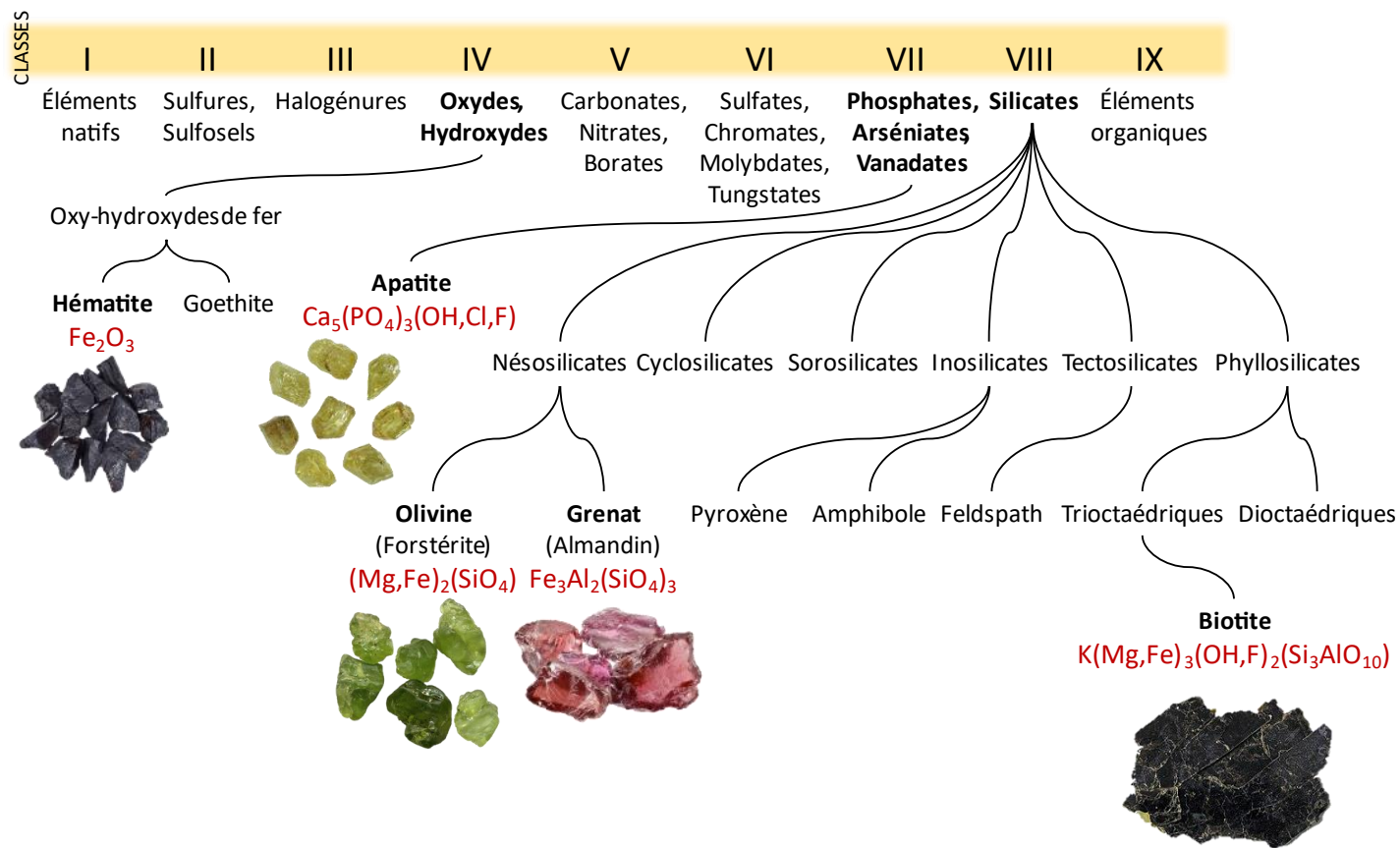


Figure 0.10 : Classification des minéraux et quelques exemples

Les minéraux sont classés en 9 catégories. L'hématite de composition théorique Fe_2O_3 fait partie des oxy-hydroxydes (classe IV), ce sont des minéraux secondaires facilement altérables. L'apatite (formule théorique : $Ca_5(PO_4)_3(OH,Cl,F)$) est classée dans les phosphates, arséniates vanadates (classe VII). Enfin, les silicates sont les minéraux les plus répandus de la croûte terrestre (90%). Ils sont caractérisés par la présence de silice qui s'organise en tétraèdre avec 4 molécules d'oxygènes dans leur structure. Parmi les néosilicates, on peut citer l'olivine ($(Mg,Fe)_2(SiO_4)$) et le grenat ($Fe_3Al_2(SiO_4)_3$) (il existe plusieurs variétés différentes d'olivine et de grenat). Les phyllosilicates comme leur nom l'indique (phyllo en grec : feuille) sont organisés en plusieurs couches de tétraèdres et octaèdres appelés feuillets. Les feuillets étant chargés négativement, il permet d'adsorber des cations entre chaque couche. L'organisation de ces couches déterminent différents groupes de phyllosilicates, parmi eux on peut citer la biotite de composition théorique $K(Mg,Fe)_3(OH,F)_2(Si_3AlO_{10})$.

- Les minéraux hérités de la roche-mère ou minéraux primaires, dépendent directement du type de roche mère sur lequel le sol est développé.
- Les minéraux néoformés ou minéraux secondaires sont formés dans les sols par précipitation d'éléments chimiques arrivés à saturation (néoformation). Les minéraux secondaires sont majoritairement des phyllosilicates, des oxy-hydroxydes plus ou moins cristallisés, des carbonates et des sulfates.

2.1.1. Classification et focus sur cinq minéraux d'intérêt

Les minéraux peuvent être classés en fonction de leur propriétés structurales et chimiques (classification de Strunz ou Dana (Dana, 1855; Strunz and Nickel, 2001)). De manière générale on distingue 9 classes de minéraux (Figure 0.10). La classe IV représente les oxydes et hydroxydes et contient l'hématite. La classe VII des arséniates phosphate et vanadates comprend l'apatite. Et enfin les silicates représentés par la classe VIII sont la classe de minéraux la plus riche et comprend entre autres la biotite, l'olivine et le grenat.

2.1.1.1. Les oxydes et hydroxydes : focus sur l'hématite

Dans les sols, les oxydes et hydroxydes sont généralement des minéraux secondaires issus de la précipitation d'éléments chimiques en solution (néoformation) (Dixon *et al.*, 1989). Parmi cette classe de minéraux, on retrouve les oxydes de fer. Ils se forment lors de l'altération de roches contenant du fer (comme la roche magmatique), le fer arrivé à saturation dans la solution reprécipite sous forme d'oxydes de fer tels que la goethite, l'hématite ou la lépidocrocite en solution ou à la surface des minéraux primaires. Les roches magmatiques (*i.e.*, granite, trachyte et rhyolite) peuvent donc contenir des grains d'hématite. L'hématite est un minéral répandu dans une grande variété de sols. Elle a également un effet de pigmentation et colore les sols en rouge. La composition chimique théorique de l'hématite est Fe_2O_3 .

2.1.1.2. Les minéraux phosphatés : focus sur l'apatite

Les minéraux phosphatés sont présents dans une large variété d'environnements (roches sédimentaires, roches magmatiques, sols...) (Dixon *et al.*, 1989). Ils ont une importance particulière pour la nutrition des plantes car ils représentent une des principales sources de

phosphate inorganique dans les sols. Parmi ces minéraux phosphatés, on distingue le groupe des apatites lui-même divisé en différentes catégories d'apatite (hydroxyapatite, fluorapatite, dahllite, francollite...). Les apatites sont retrouvées dans des inclusions de minéraux primaires de roches magmatiques. Seulement certaines formes d'apatite sont largement répandues dans l'environnement comme la fluorapatite ou l'hydroxyapatite. Par exemple, la fluorapatite provient des roches magmatiques et l'hydroxyapatite est issue de l'altération des roches calcaires. Ces deux formes d'apatite sont également utilisées comme fertilisants. La composition chimique théorique de l'apatite est $\text{Ca}_5[\text{PO}_4]_3(\text{OH},\text{F})$.

2.1.1.3. Les silicates : focus sur l'olivine, le grenat et la biotite

Les silicates sont les minéraux primaires les plus abondants de la croûte terrestre (plus de 90 %) (Garrels and Mackenzie, 1971). Notamment le quartz est le représentant des silicates le plus abondant. Les silicates sont caractérisés par la présence de silice et d'oxygène qui forment des tétraèdres (T) SiO_4 ou octaèdre (O) SiO_8 (Dixon *et al.*, 1989). Les charges négatives portées par l'oxygènes sont neutralisées par la fixation de divers cations (K^+ , Mg^{2+} , Ca^{2+} , Al^{3+} ...).

L'organisation des tétraèdres de silice détermine les différentes catégories de silicates. On distingue alors les néosilicates où les tétraèdres sont sous forme d'anions $(\text{SiO}_4)^{4-}$ des phyllosilicates où les tétraèdres s'assemblent entre eux pour former différentes couches de silices. L'olivine et le grenat font partie des néosilicates tandis que la biotite fait partie des phyllosilicates.

L'olivine

L'olivine est un minéral répandu dans certaines roches magmatiques et peut se retrouver dans les sols et les sédiments (Dixon *et al.*, 1989). Il existe plusieurs types d'olivine qui diffèrent en fonction de leur composition chimique (*i.e.*, forstérite, fayalite...). Par exemple, la forstérite (Mg_2SiO_4 ; utilisé pour les expérimentations du CHAPITRE 4) et la fayalite (Fe_2SiO_4) sont les pôles magnésien et ferreux des olivines. Ces minéraux fortement solubles dans les sols en font une excellente source de nutriments pour les organismes vivants.

Le grenat

Le grenat est un des composants majoritaires des roches métamorphiques (Dixon *et al.*, 1989). Il existe différents types de grenat en fonction de leur composition (*i.e.*, almandin, pyrope,

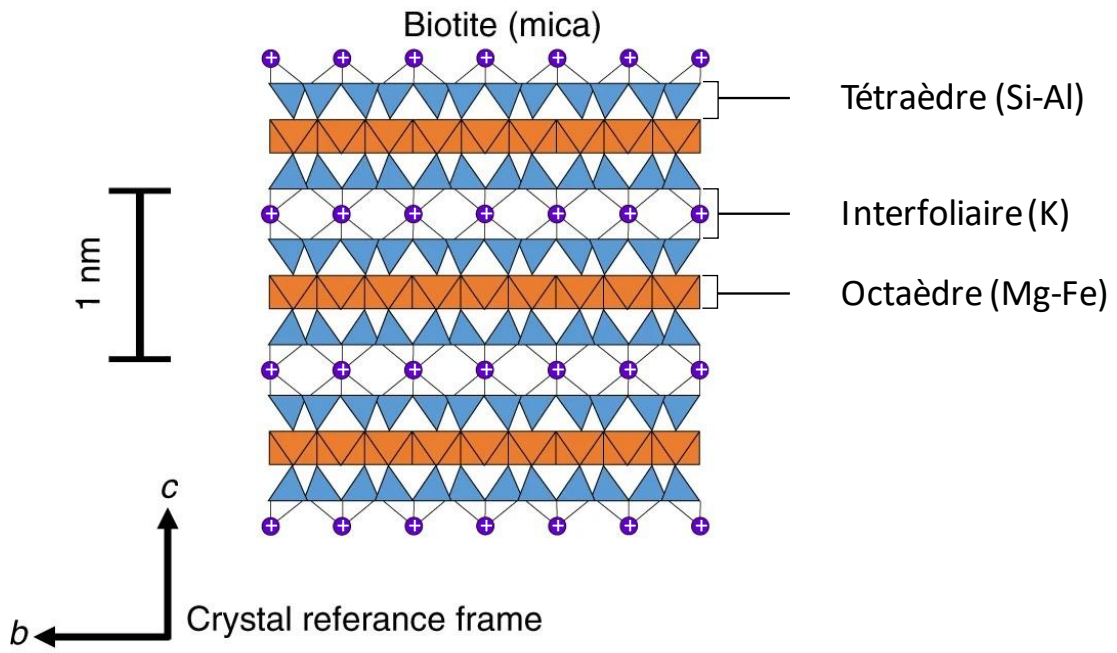


Figure 0.11 : Structure de la biotite inspiré de Aslin *et al.*, 2019

La biotite de composition théorique $K(Mg,Fe)_3(OH,F)_2(Si_3AlO_{10})$ est un phyllosilicate organisé en différentes couches de Si, Mg, Al, Fe (feuille). Chaque feuille de silice suit l'ordre suivant : tétraèdre, octaèdre, tétraèdre (TOT). Les feuilles étant chargés négativement, ils adsorbent à leur surface des cations (K^+) au niveau de l'interfoliaire.

sciagite...). Par exemple, l'almandin est composé d'aluminium et de fer ($Al_3Fe_2(SiO_4)_3$; i a été utilisé pour les expérimentations du CHAPITRE 4).

La biotite

Les phyllosilicates sont des silicates, formés de différentes couches (tétraédrique/tétraèdre essentiellement de Si ; octaédrique/octaèdre essentiellement de Al, Fe, Mg) constituant un feuillet (Dixon *et al.*, 1989). Les feuillets sont fréquemment chargés négativement, cette charge négative est compensée par l'adsorption de cations dans l'interfoliaire (Figure 0.11) (Aslin *et al.*, 2019). L'organisation des couches tétraédrique et octaédrique dans le feuillet détermine les différentes classes de phyllosilicates et parmi elles les micas ont un feuillet composé d'une couche d'octaèdre encadré par 2 couches de tétraèdre (TOT) avec une charge élevée (1 par maille) compensée par du potassium dans l'interfoliaire. Les micas font partis de la composition du granite et des roches acides. Parmi les micas, la biotite est largement répandue dans les sols, elle peut être retrouvée dans la composition des roches magmatiques et métamorphiques. Sa composition théorique ($K(Mg,Fe)_3(OH,F)_2(Si_3AlO_{10})$) indique qu'elle présente une source de cations nutritifs tels que le potassium ou le magnésium importants pour la croissance des plantes.

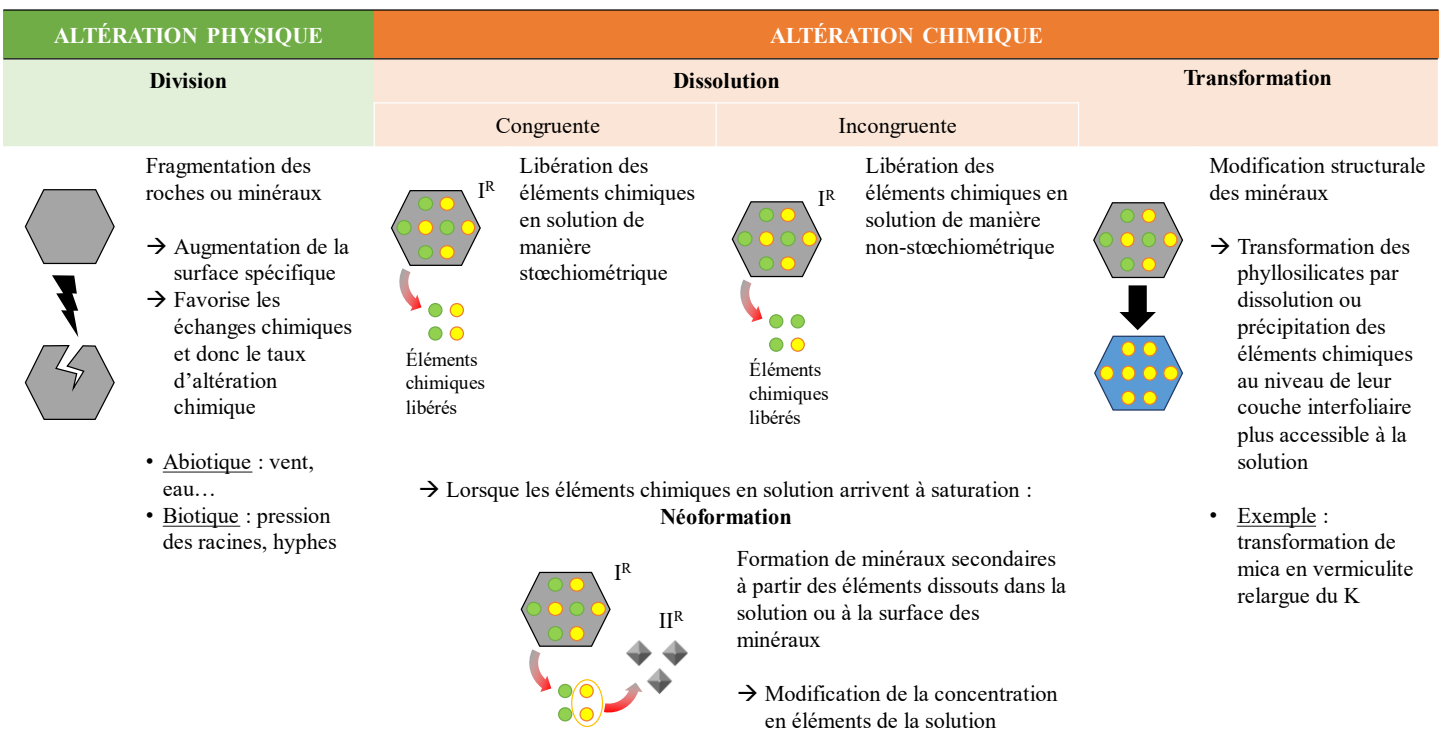
2.2. L'altération des minéraux : différents processus impliqués

Le processus d'altération des minéraux correspond à des mécanismes physiques et chimiques menant à la libération ou à la précipitation d'éléments chimiques. On distingue la division, la dissolution, la transformation et la néoformation.

2.2.1. L'altération physique

2.2.1.1. La division

Il s'agit d'un processus de fragmentation physique des roches ou minéraux correspondant à une diminution de la taille des blocs ou des grains. La division peut être due à des mécanismes abiotiques tels que l'érosion (action mécanique du vent ou de l'eau (Hilley *et al.*, 2010)), des variations de températures (Bahr *et al.*, 1986; Hall *et al.*, 2008) ou des phases de gel et de dégel (*i.e.*, cryoclastie). L'eau, s'infiltrant dans les fissures des roches, se solidifie lors de périodes de gel. L'augmentation du volume d'eau lors de sa solidification fragmente les roches, lors du



I^R : minéraux primaires
 II^R : minéraux secondaires

Figure 0.12 : Les processus d'altération des minéraux

L'altération des minéraux peut être liée à des processus physiques (vert) ou chimique (orange). L'altération chimique regroupe plusieurs type d'altération : (i) la dissolution qui est la libération d'éléments chimiques en solution à partir du minéral. Dans les sols, l'accumulation d'éléments chimiques *via* la dissolution des minéraux peut par la suite mener à des reprécipitations de certains éléments pour former des minéraux secondaires, c'est la néoformation (ii). (iii) la transformation est également un type d'altération chimique menant à une modification structurale des minéraux.

dégel, l'eau s'infiltré alors un peu plus dans les fissures formées et ainsi de suite (Charre and Lautridou, 1975; Matsuoka and Murton, 2008). D'autre part, des acteurs biotiques sont impliqués dans la division des roches notamment *via* la pression exercée par les racines ou les hyphes des champignons qui scindent les minéraux (Jongmans *et al.*, 1997; Mottershead *et al.*, 2003; Bonneville *et al.*, 2009).

Ce processus en augmentant la surface des minéraux exposés à la solution du sol augmente leur altérabilité chimique.

2.2.2. L'altération chimique

Ce type d'altération est due à des agents/processus chimiques et se traduit par différentes réactions : la dissolution, la néoformation et la transformation.

2.2.2.1. La dissolution

La dissolution est une réaction qui conduit à la libération des éléments chimiques dans la solution et à la destruction partielle (voire totale) de l'intégrité du minéral (exemple imagé du sucre fondant dans un café). La dissolution d'un minéral peut être (Figure 0.12) :

- **Congruente** : les constituants du minéral passent simultanément en solution. Leur rapport stœchiométrique en solution est identique à celui du minéral initial.
- **Incongruente** : les éléments chimiques contenus dans les minéraux se dissolvent de manière non stœchiométrique. La dissolution incongruente peut être liée (i) à la précipitation d'ions en solution arrivés à saturation (**néoformation**) ou (ii) à une dissolution sélective de certains constituants de par leur accessibilité ou leur solubilité. Une dissolution sélective peut mener à la modification du minéral (**transformation**).

2.2.2.2. La néoformation

La néoformation est la précipitation d'un nouveau minéral (solide) à partir des ions en solution arrivés à saturation (exemple du sel cristallisant dans les marais salants).

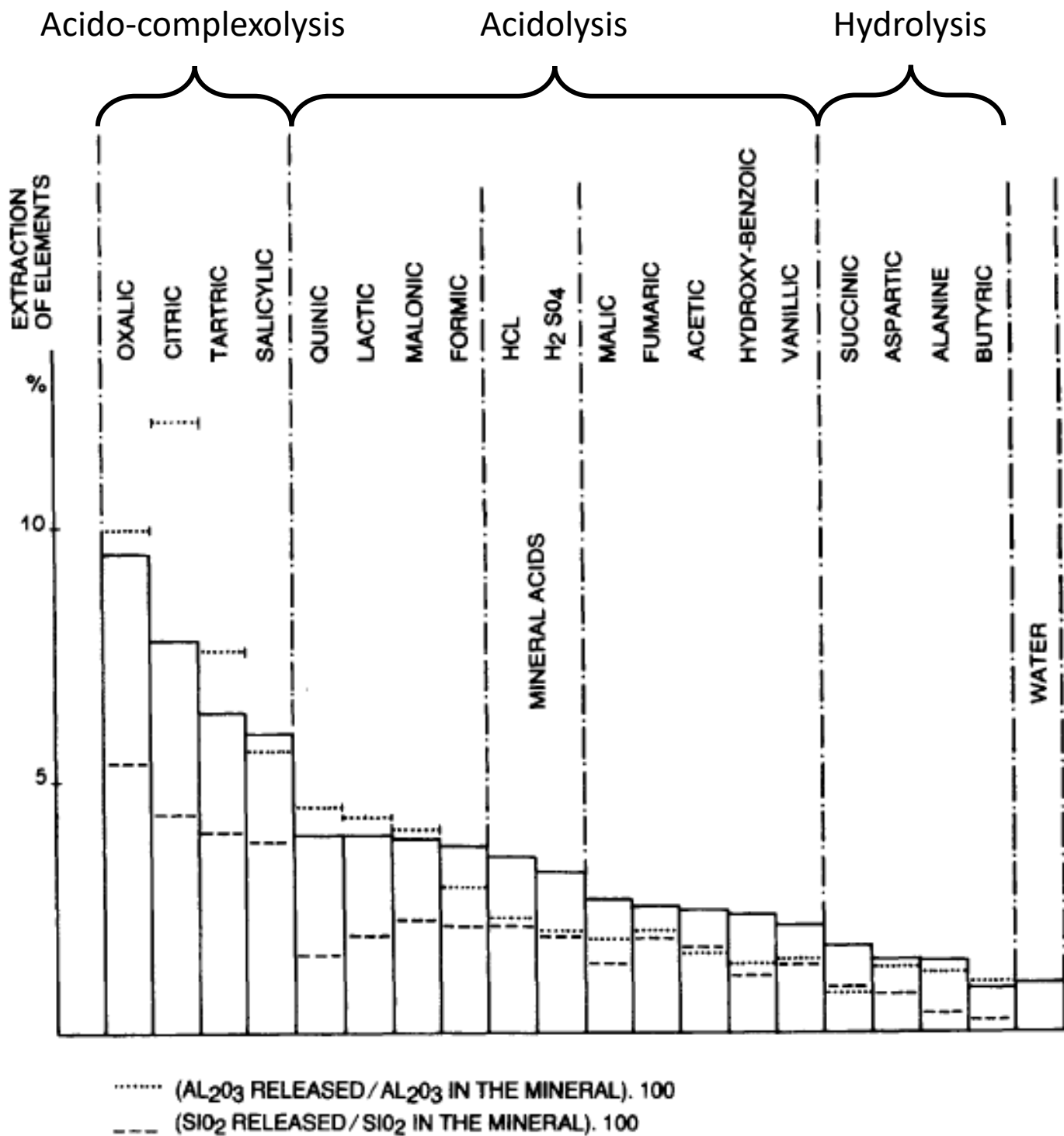


Figure 0.13 : Action des acides organiques sur l'altération de la phlogopite (Robert and Berthelin, 1986)

Cette figure représente le taux de relargage d'éléments par la phlogopite en présence de différents acides organiques à 60 °C. On peut catégoriser les acides organiques en fonction de leur action sur le minéral. Les acides oxalique, citrique, tartrique et salicylique ont une action à la fois complexante et acidifiante, les acides quinique, lactique, malonique, formique, malique, fumarique, acétique, hydroxy-benzoïque et vanillique ont une action similaire aux acides inorganiques (acide chloridrique et acide sulfurique) qui agissent par acidolyse. Enfin les acides succinique, aspartique et butyrique agissent par hydrolyse.

2.2.2.3. La transformation

La transformation est une réaction qui, suite à l'échange de composants chimiques (ions, électrons...) entre le minéral et la solution (dissolution ou précipitation partielle ; réaction d'oxydo-réduction) entraîne une modification structurelle majeure conduisant à une autre dénomination minéralogique. La transformation peut conduire à une libération ou une consommation d'ions en solution. Par exemple, la transformation de mica en vermiculite libère du potassium en solution (Besson *et al.*, 1966; Vicente *et al.*, 1977) alors que la transformation de vermiculite en vermiculite hydroxy-aluminineuse consomme de l'aluminium (Dixon *et al.*, 1989).

2.2.3. Les mécanismes chimiques de l'altération

C'est au niveau des surfaces d'échanges entre le minéral et l'environnement extérieur (solution) qu'à lieu l'altération chimique. La surface du minéral intègre la surface externe mais aussi les pores et fissures du minéral. L'altération chimique est en général proportionnelle à la surface du minéral sauf en système fermé si elle est limitée par la diffusion.

On distingue trois grands mécanismes chimiques de l'altération : l'acidolyse, la complexolyse et les mécanismes d'oxydo-réduction.

2.2.3.1. L'acidolyse

L'**acidolyse** est la dissolution due à une acidification du milieu environnant. Elle est liée à l'action de protons H^+ qui réagissent avec les minéraux menant à leur dissolution. Si ces protons proviennent de la dissociation de l'eau H_2O en ions H^+ et OH^- , on parle alors d'**hydrolyse**. Les acides organiques ou inorganiques jouent également un rôle dans l'acidolyse (Figure 0.13 (Robert and Berthelin, 1986)).

Tous les minéraux sont sensibles à l'acidolyse avec plus ou moins d'intensité (Brammall and Leech, 1937).

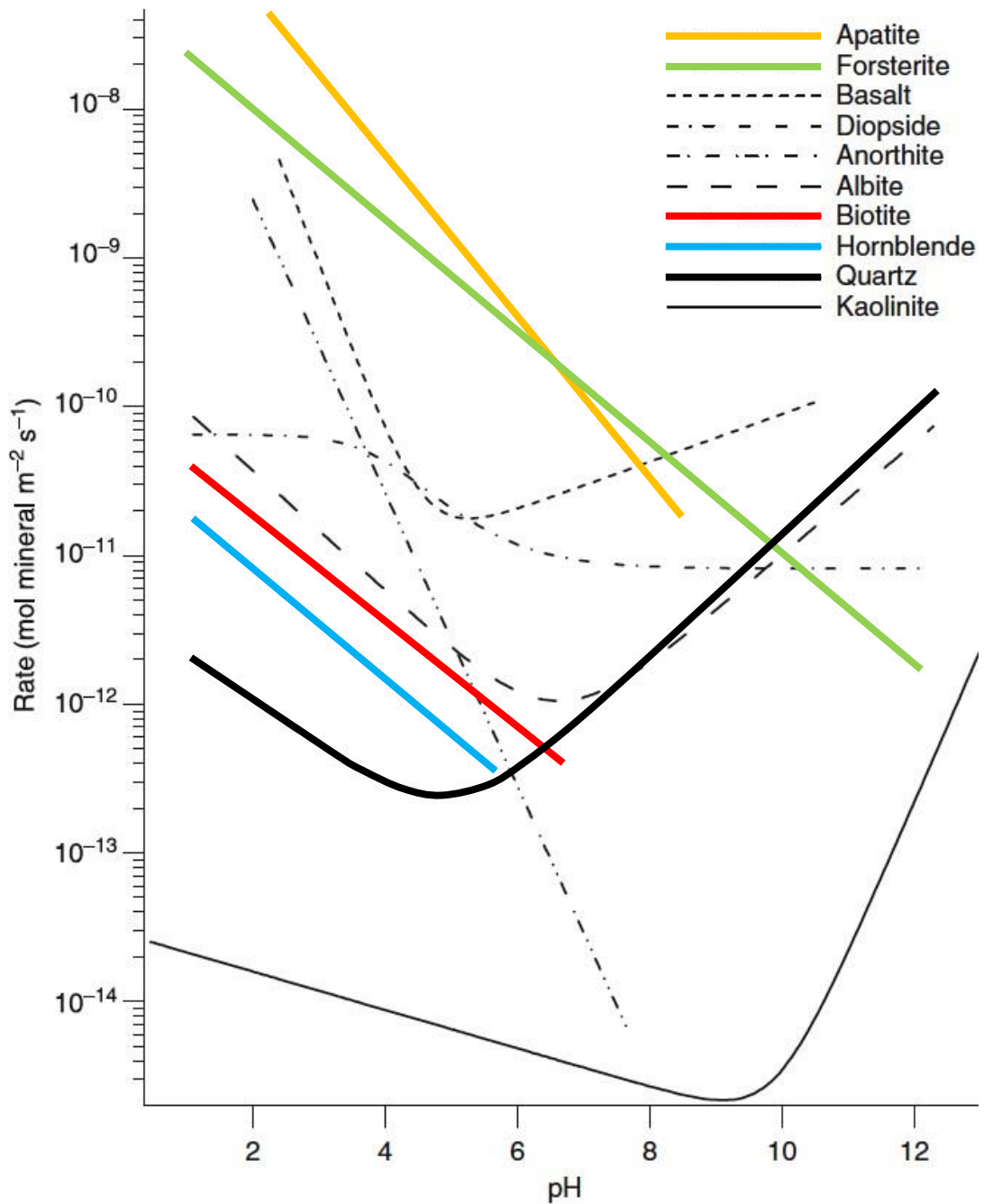


Figure 0.14 : Altérabilités des minéraux en fonction du pH (Brantley, 2008)

Ce graphique représente les taux de dissolution exprimé en mol/m²/s en fonction du pH de plusieurs types de minéraux. Les minéraux les plus altérables sont situés en haut du graphique tandis que les minéraux les moins altérables sont situés en bas du graphique. Grâce à cette représentation visuelle, l'altérabilité est comparée entre chaque type de minéraux. Ainsi, on peut souligner que l'apatite et la forestérite (type d'olivine) sont plus altérables que la biotite.

2.2.3.2. La complexolyse

La **complexolyse** est une dissolution du minéral suite à la chélation de ses éléments chimiques. Elle peut se faire de manière directe sur le minéral ou de façon indirecte en chélatant les éléments déjà en solution provoquant un déséquilibre de la solution et conduisant à une dissolution passive du minéral. Les agents complexants responsables de la complexolyse sont toutes les molécules ayant un pouvoir chélateur (sidérophores, polysaccharides...). De plus, certains acides, en plus de leur pouvoir acidifiant ont un pouvoir complexant, on parle alors d'**acido-complexolyse**. Par exemple, les acides polycarboxyliques (acide oxalique, acide citrique, acide tartrique, acide salicylique, acide acétique ; Figure 0.13) ont un rôle chélatant démontré sous action acidifiante (Robert and Berthelin, 1986).

2.2.3.3. L'oxydo-réduction

L'**oxydation** ou la **réduction** d'éléments chimiques (éléments métalliques, par exemple : Fe, Mn...) présents dans la composition de certains minéraux conduit à un changement de la stabilité du minéral qui influence sa dissolution. En effet, en fonction de l'état d'oxydation des composés chimiques contenus dans le minéral leur dissolution est plus ou moins efficace (van der Weijden and van der Weijden, 1995). Par exemple, la réduction du Fe(III) des smectites modifie la surface spécifique et augmente la susceptibilité de ce minéral vis-à-vis des phénomènes de dissolution et de transformation (Stucki and Kostka, 2006).

2.2.4. Les minéraux ont une altérabilité variable

Les analyses chimiques et les tests d'altération en conditions contrôlées ont révélé que les minéraux présentent des propriétés physicochimiques (*i.e.*, composition, organisation, taille) qui vont les rendre plus ou moins réactifs aux conditions environnementales. On parle de leur altérabilité, qui se définit comme le niveau d'altération dans des conditions données. A titre d'exemple, on différencie, par rapport à une attaque acide les amphiboles et pyroxènes qui sont plus altérables que les feldspaths, eux-mêmes plus altérables que le quartz (figure 0.14 ; (Brantley, 2008; White and Buss, 2014). Les minéraux de petite taille présenteront une altération plus rapide et une réactivité plus importante, expliquée par une surface spécifique supérieure à celle de minéraux plus gros.

L'altérabilité d'un minéral peut être évaluée par sa vitesse de dissolution (V_m) représentée par l'équation suivante (Madé, 1991) :

$$V_m = K_m \times S_m \times \alpha_j^n \times (1 - Q_m/K_m)$$

V_m : vitesse de dissolution du minéral (m) (mol/an).

K_m : constante de dissolution **intrinsèque** du minéral (mol/m²/an).

S_m : surface de contact entre le minéral et la solution (m²/kg). Cette surface dépend de la taille et porosité du minéral et est donc un facteur **intrinsèque**.

α_j^n : activité de l'agent altérant en solution (espèce aqueuse ; j ; ex : H⁺, OH⁻...) en prenant en compte la dépendance de la vitesse de dissolution du minéral par rapport à l'agent altérant (n). Cette activité dépend de l'agent altérant il est donc considéré comme un facteur **extrinsèque**.

$1 - Q_m/K_m$: indice de saturation des éléments chimiques libérés à partir du minéral. Cet indice dépend de la composition chimique de la solution c'est donc un paramètre **extrinsèque**.

Q_m : produit d'activité ionique du minéral (sans unité), il dépend du minéral c'est donc un facteur **intrinsèque**.

L'altération des minéraux dépend donc des **facteurs intrinsèques** aux minéraux (*i.e.*, leurs propriétés physico-chimiques) et des **facteurs extrinsèques** (*i.e.*, pH, solution de sol, température...).

2.3. L'altération des minéraux, un phénomène répandu aux conséquences diverses

2.3.1. Contextes divers de l'altération des minéraux

L'altération des minéraux est un phénomène commun rencontré dans des contextes variés tels que la santé humaine, le patrimoine culturel, le bâtiment ou l'environnement... Par exemple, les dents sont des biominéraux composés d'hydroxyapatite (Ca₅(PO₄)₃(OH)), leur altération par les microorganismes présents dans la cavité buccale mène à la formation de caries. Au niveau du patrimoine culturel, les roches utilisées pour la construction de monuments historiques (églises, statues...) ou les vitraux peuvent être altérés et donc dégradés au cours du temps (Hirsch *et al.*, 1995; Saiz-Jimenez, 1999; Ferrand *et al.*, 2015). En ce qui concerne le bâtiment, la serpentinite autrement appelé amiante a longtemps été utilisée comme matériau de construction. Ce minéral de la famille des phyllosilicates présente des fibres en forme d'aiguille,

son inhalation est toxique et peut entraîner des cancers du poumon. L'altération de la serpentinite entraîne des variations d'état et réduit sa toxicité (David and Geoffroy, 2020).

2.3.2. Les conséquences de l'altération des minéraux sur l'environnement

D'un point de vue environnemental, l'altération des minéraux et roches façonne les paysages (érosion...), améliore la qualité de l'air et participe à l'atténuation des changements climatiques en consommant du CO₂ (Berner, 2003). Par exemple, l'altération des silicates de calcium et de magnésium influencent les concentrations de CO₂ dans l'atmosphère sur une centaine d'années, ce qui a un impact sur le cycle mondial du carbone (Brantley, 2008).

Au niveau des sols, l'altération physique et chimique de la roche-mère permet la pédogénèse¹⁵. Le sol présente des caractéristiques qui découlent directement de la nature de la roche-mère. De plus, la fragmentation de la roche et des minéraux détermine la texture du sol (proportion de sable, limon et argile). L'altération des minéraux augmente également la fertilité des sols grâce à la libération de leur contenu chimique en solution.

2.3.2.1. Focus sur la dissolution des minéraux dans les sols

La dissolution des minéraux mène à la libération d'éléments chimiques en solution, qui peuvent être des cations nutritifs (K, Mg, Ca...) et du phosphore, ou au contraire des éléments toxiques (As, Al, Pb...). L'altération des minéraux peut donc avoir différents effets sur le sol et la biosphère.

Effet toxique

Certains minéraux peuvent contenir des éléments chimiques toxiques pour le vivant tels que l'aluminium (Al(III)), l'arsenic (As(III) et As(V)), le mercure (Hg(II)), le cadmium (Cd(II)), l'argent (Ag(I)), le plomb Pb(II), l'antimoine (Sb(III)), le bismuth (Bi(III)) (Collier and Greenwood, 1977; Silver, 1983). Par exemple, l'aluminium est présent dans la composition de différents minéraux comme la gibbsite (GIS Sol, 2011), la montmorillonite et la vermiculite (Sawhney, 1958; Skyllberg, 1999). Leur altération résulte en la libération d'ion aluminium dans la solution de sol. De la même manière, l'arsenic est présent dans une large variété de minéraux

¹⁵ Processus menant à la formation, transformation et différenciation des sols.

dont l'apatite (Song *et al.*, 2006). L'altération de ces minéraux entraîne la libération d'arsenic (Mailloux *et al.*, 2009) menant à la contamination des sols (jusqu'à 100 mg/kg ou plus d'arsenic ce qui est plus du double des concentrations retrouvées dans un sol non-contaminé) (Lepp, 1981).

Effet bénéfique des nutriments (macro-, micro-éléments et autres éléments bénéfiques)

A l'inverse, la libération d'éléments chimiques (cations nutritifs, phosphore) suite à l'altération des minéraux peut être favorable à la nutrition et la croissance des plantes. Ces éléments chimiques peuvent être divisés en différentes catégories : les macroéléments (P, K, Mg, Ca...), les microéléments (Fe, Mn...) et d'autres éléments bénéfiques (Si...).

Quelques exemples de macroéléments :

Certains minéraux contiennent des quantités non-négligeables de macroéléments (*i.e.*, P, K, Mg, Ca...). On peut citer l'apatite qui est un bon pourvoyeur en P et Ca et la biotite en K et Mg. Ces éléments sont utilisés dans la synthèse de nombreuses protéines et carbohydrates constituant la biomasse végétale (Clarkson and Hanson, 1980). Par exemple, le calcium est un élément utilisé dans la composition de la paroi cellulaire et augmente la stabilité membranaire des végétaux (Hepler and Wayne, 1985). En ce qui concerne les bactéries, le calcium participe à la stabilité membranaire, la motilité et les processus de transport et de différenciation (sporulation) (Dominguez, 2004).

Quelques exemples de microéléments :

Les minéraux peuvent contenir des quantités importantes de métaux tels que le fer ou le manganèse, comme certains silicates (biotite, olivine, grenat...) ou les oxyde-hydroxydes (hématite, goethite...). Ces ions métalliques fournissent les électrons nécessaires aux réactions d'oxydo-réduction pour les organismes vivants comme les plantes ou les microorganismes. Ces réactions sont impliquées dans la photosynthèse, la respiration, les défenses contre les pathogènes, ou la lutte contre les ROS (Reactive Oxygen Species) (Alejandro *et al.*, 2020). De manière globale, ces éléments améliorent la croissance des plantes : les plants de laitue, épinard, blé et avoine ont une meilleure croissance en présence de manganèse comparée aux plants en absence de manganèse (McHargue, 1926).

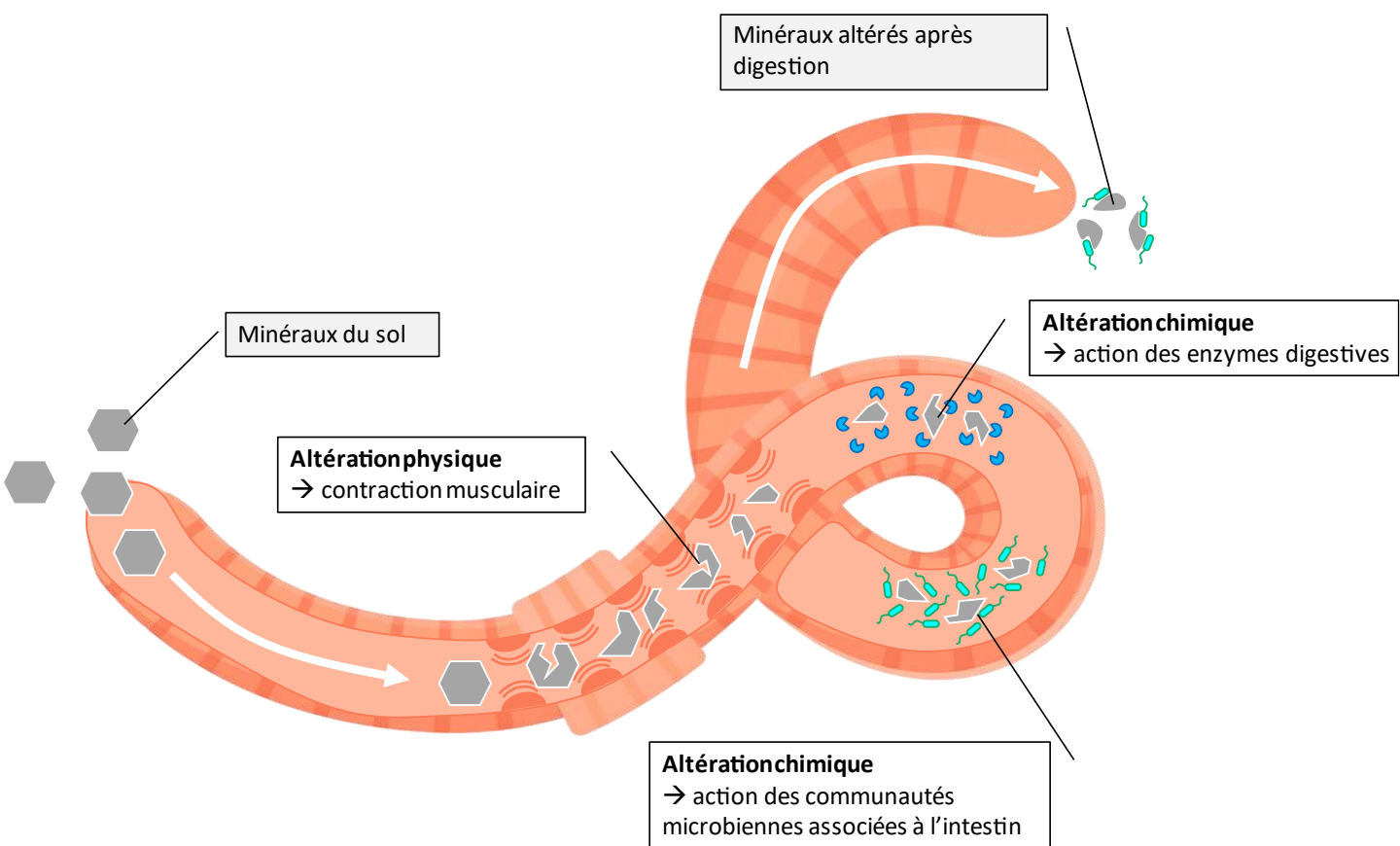


Figure 0.15 : Altération des minéraux par les vers de terre

Les minéraux sont ingérés par les vers de terre, ils subissent une altération physique *via* les contractions musculaires du vers (Edwards et Bohlen, 1996 ; Suzuki *et al.*, 2003), et une altération chimique par les communautés microbiennes liées à l'intestin et l'action des enzymes digestives (Carpenter *et al.*, 2007 ; Liu *et al.*, 2011).

*Ce schéma n'est pas à l'échelle (taille des minéraux/enzymes/bactéries par rapport au vers de terre) et représente les différents processus d'altération des minéraux par les vers de terre qui agissent simultanément.

D'autres éléments bénéfiques :

Le silicium, présent dans la composition des silicates est absorbé par les plantes. Il est localisé au niveau membranaire et est utilisé par les plantes entre autres pour diminuer les stress biotiques et abiotiques qu'elles subissent (Currie and Perry, 2007).

2.4. Implication des acteurs biotiques dans l'altération des minéraux

Dans les écosystèmes à faibles intrants comme les déserts ou les forêts, les minéraux et roches représentent non seulement une des principales sources de nutriments inorganiques, mais aussi un habitat potentiel pour certains microorganismes. Les organismes et microorganismes vivants dans ces environnements ont donc développé des singularités fonctionnelles et parfois la capacité à altérer les minéraux. Même si leur rôle direct n'est pas toujours établi, on pourra noter que les plantes, les insectes, les vers de terre, les champignons, les lichens et les bactéries ont été décrits comme ayant un rôle dans l'altération des minéraux à différentes échelles et avec différentes efficacités.

2.4.1. Implication des insectes et vers de terre

La macrofaune du sol a longtemps été sous-estimée mais son rôle dans l'altération des minéraux a été démontré notamment pour les larves de scarabée, les vers de terre ou les termites. La macrofaune peut agir de manière physique, c'est le cas des larves de scarabée *Protaetia lugubris insperata* qui fractionnent les minéraux avec leurs mandibules (Suzuki *et al.*, 2003) ou le ver de terre *Eisenia foetida* qui divise les minéraux par contraction des muscles de l'intestin (Edwards and Bohlen, 1996; Suzuki *et al.*, 2003). La macrofaune peut aussi altérer de façon chimique les minéraux. Le ver de terre *Eisenia veneta* altère chimiquement les minéraux de petite taille (anorthite, biotite, smectite, kaolinite) par l'action d'enzymes digestives (action directe) et des communautés bactériennes associées au tractus intestinal (action indirecte) (Figure 0.15 (Carpenter *et al.*, 2007; Liu *et al.*, 2011)). Dans son organisme, des phases oxiques/anoxiques se succèdent. Ces changements d'états et les processus et microorganismes associés jouent probablement un rôle dans le transit et l'altération des minéraux ingérés. Enfin, les termites et notamment *Odontotermes* nr. *Pauperans* modifient les propriétés des minéraux (par exemple les argiles en diminuant leurs charges) menant à leur altération (Jouquet *et al.*, 2002).

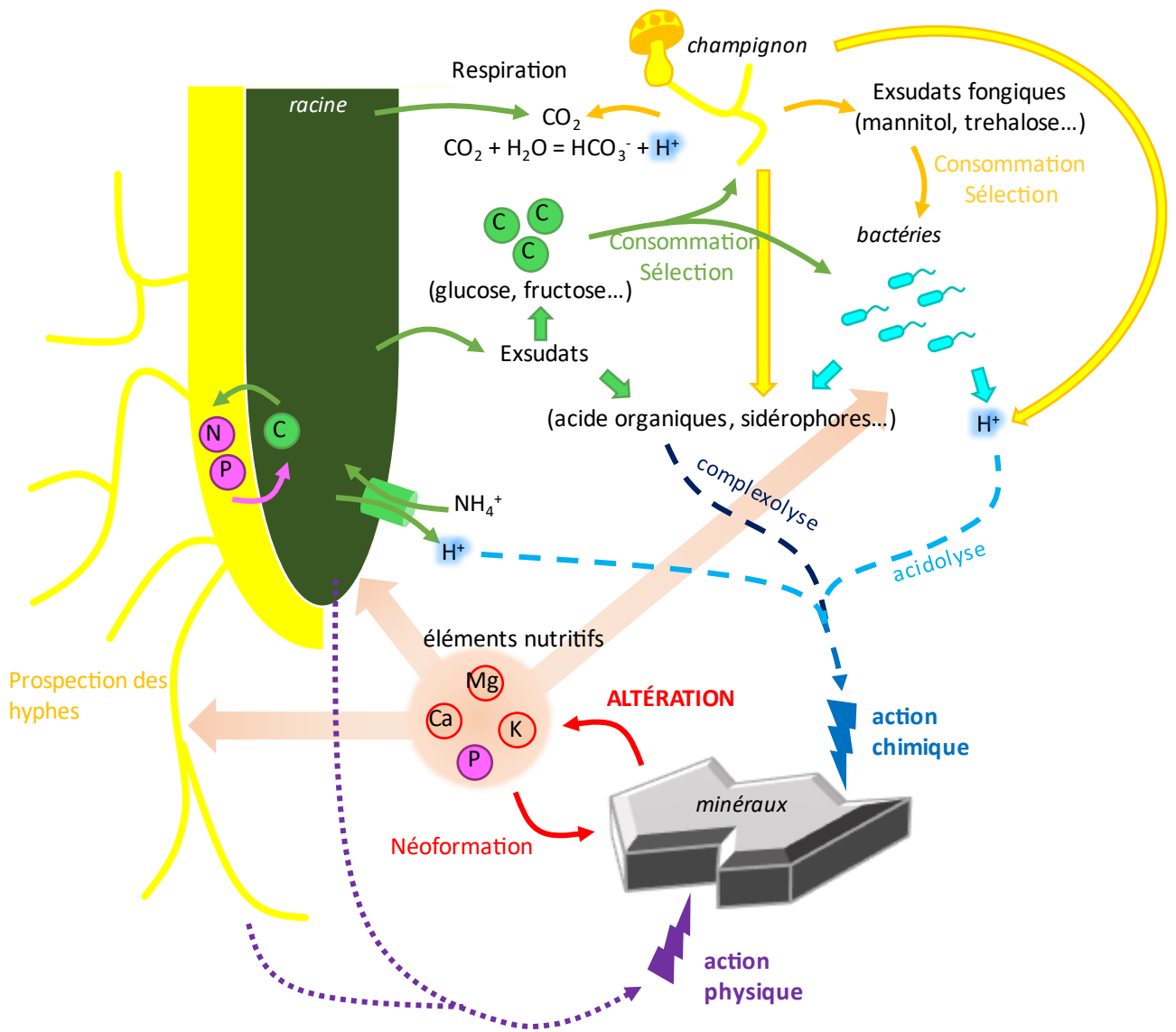


Figure 0.16 : schéma global de l'altération des minéraux par les racines, champignons et bactéries

L'altération des minéraux est due à une action physique (violet) exercée par la pression des hyphes ou des racines qui fragmente la roche. Elle peut également être due à une action chimique (bleu). L'altération chimique est le résultats de mécanismes d'acidolyse (production de protons ; bleu clair) ou de complexolyse (agents chélatants tels que les sidérophores ou les acides organiques ; bleu foncé). Les plantes (vert) tout comme les champignons (jaune) sécrètent des exsudats dans leur environnement dont les bactéries se nourrissent. Ces exsudats sélectionnent certaines bactéries aux propriétés intéressantes (altération des minéraux).

2.4.2. Implication des plantes

Pour déterminer l'implication des plantes dans l'altération des minéraux, la comparaison de minéraux incubés dans le sol en présence ou absence de racines a été réalisée (Turpault *et al.*, 2009). Notamment, des minéraux tels que l'apatite ou la labradorite ont été incubés pendant 4 ans dans un sol sans racines ou au pied d'un hêtre, l'utilisation de « mesh bags » a permis de contrôler la présence de racines (en fonction de la taille des mailles du sachet : (i) 300 µm : les racines peuvent pénétrer le sachet permettant un contact direct entre racines et minéraux ; (ii) 20 µm : empêche les racines de pénétrer le sachet). Comparativement au sol sans racines, les minéraux en présence de racines ont une altération accrue. Cette intensification peut s'expliquer par différents processus physiques ou chimiques (Figure 0.16).

L'action des plantes peut être directe au travers de la pression mécanique exercée par les racines (Mottershead *et al.*, 2003). Elle est facilement observable sur des édifices en pierre abandonnés qui sont rapidement recolonisés et détériorés par les plantes. Au niveau chimique, (i) l'absorption de cations par les racines dans le sol est accompagnée de la libération de protons H^+ entraînant une acidification du sol au voisinage des racines. C'est le cas de l'ammonium NH_4^+ qui provoque le phénomène d'extrusion de protons¹⁶ (Sas *et al.*, 2001). (ii) La respiration par les racines ou par les microorganismes rhizosphériques produit du CO_2 (Hinsinger *et al.*, 2003). Plus la concentration en CO_2 augmente, plus le pH de la solution de sol diminue. En effet, le CO_2 réagit avec l'eau pour former de l'acide carbonique et un proton¹⁷ acidifiant le milieu environnant (Kelly *et al.*, 1998). Tous ces processus d'acidification mènent à une acidolyse des minéraux du sol. (iii) Enfin, les plantes peuvent complexer les éléments des minéraux (directement à partir du solide ou ceux en solution) grâce à la sécrétion de chélateurs tel que l'oxalate (qui a une affinité particulière pour l'aluminium, le fer, le calcium...) (Drever, 1994) ou des phytosidérophores (Reichard *et al.*, 2005).

La comparaison de différentes essences d'arbres plantées sur un même sol a révélé que toutes n'ont pas la même efficacité vis-à-vis de l'altération des minéraux. Les essences résineuses comme l'épicéa commun ou le pin sylvestre, conduisent à une altération des minéraux 3 à 4 fois plus forte que les essences feuillues comme le hêtre ou le chêne (Augusto *et al.*, 2000b).

¹⁶ Pour maintenir l'équilibre chimique de la solution, l'assimilation de NH_4^+ se fait de manière simultanée avec la sécrétion d'un proton.

¹⁷ $CO_2 + H_2O = HCO_3^- + H^+$

D'autres mécanismes indirects comme la sélection de microorganismes (champignons et bactéries) au niveau racinaire peuvent entraîner une augmentation de l'altération des minéraux (voir ci-dessous) (Colin *et al.*, 2017a).

2.4.3. Implication des champignons

La capacité à altérer les minéraux a été reportée pour de nombreuses espèces de champignons provenant des sols en association ou non avec des plantes (*Penicilium*, *Mucor*, *Scleroderma*, *Paxillus*, *Cenococcum*, *Piloderma*, *Thelephora*...) (Crawford *et al.*, 2000; Courty *et al.*, 2010; Brunner *et al.*, 2011). Pour les écosystèmes forestiers, l'altération des minéraux a majoritairement été étudiée chez les champignons symbiotiques (Paris *et al.*, 1996; Jongmans *et al.*, 1997; Landeweert *et al.*, 2001).

Les champignons sont capables d'altérer de manière physique les minéraux grâce à la pression exercée par leurs hyphes (Bonneville *et al.*, 2009). Cette action mécanique est concomitante aux mécanismes chimiques de l'altération (acidolyse et complexolyse) (Figure 0.16). Le principal mécanisme de l'altération des minéraux par les champignons est la production d'acides organiques et notamment l'oxalate (Barker *et al.*, 1997). L'oxalate est un des acides organiques les plus répandus dans les sols forestiers. Il entraîne la dissolution de différents minéraux comme l'apatite (Wallander, 2000a), la biotite (Wallander, 2000b), la phlogopite (Paris *et al.*, 1996) et d'autres (Schmalenberger *et al.*, 2015) grâce à son action acidifiante et complexante. La majorité des champignons associés aux plantes sont capables de produire de l'oxalate (Courty *et al.*, 2010). D'autres acides organiques sécrétés par les champignons altèrent les minéraux : acide malique, acide citrique, acide acétique, acide succinique (Wallander and Wickman, 1999; Wallander, 2000a; Wallander and Hagerberg, 2004; Courty *et al.*, 2010). D'autre part, les champignons sécrètent des molécules chélatrices telles que des sidérophores. La plupart des champignons mycorhiziens produisent des sidérophores de type hydroxamate (ferricrocine, fusigène...) (Hoffland *et al.*, 2004). Par exemple, la solubilisation du fer à partir de goethite par le champignon ectomycorhizien *Suillus granulatus* a été attribuée à la production de sidérophores (Watteau and Bertherlin, 1994). Néanmoins, beaucoup de ces démonstrations n'ont pas été conduites en conditions axéniques et souvent en interaction avec une plante hôte, ces champignons ayant une croissance lente sur milieu de culture.

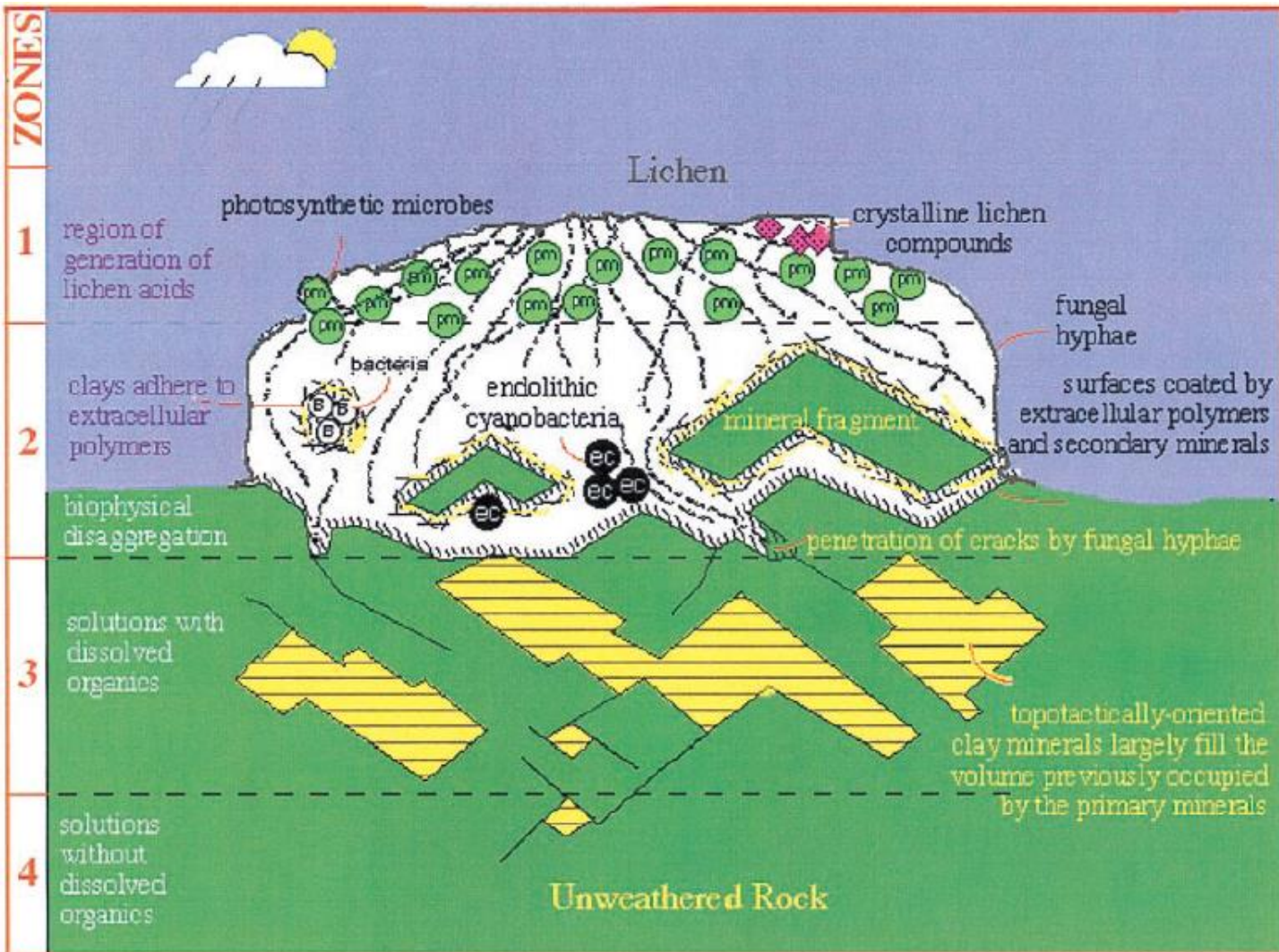


Figure 0.17 : Altération des minéraux par les lichens (Banfield *et al.* 1999)

Cette figure présente les différents états de la roche colonisée par un lichen. Pour aider à la lecture, le schéma est présenté du bas vers le haut.

La zone 4 représente la roche non-altérée.

L'altération de la roche et minéraux par des molécules organiques (acides principalement) est représentée dans la zone 3.

La zone 2 est une zone où les cellules et les molécules produites (dont les EPS) sont en contact direct avec les minéraux altérés.

Les membres photosynthétiques du lichen fixent le carbone et produisent les acides lichéniques dans la zone 1.

2.4.4. Implication des lichens : des pionniers dans la colonisation des roches

Les lichens sont capables de coloniser des environnements extrêmes comme les roches dont ils sont souvent les premiers colonisateurs et ce sur des temps longs (Haas and Purvis, 2006). Le lichen est un organisme symbiotique composé d'un mycobionte (champignons), de microorganismes photosynthétiques (algues et/ou cyanobactéries) et de bactéries (Banfield *et al.*, 1999).

L'action du lichen est très localisée car il a une croissance lente. Les lichens altèrent les minéraux en différentes étapes alternant entre processus physiques et chimiques. Les hyphes fongiques pénètrent les fissures et pores de la matrice minérale colonisée, et provoquent une fragmentation physique du substrat rocheux. Le lichen dissout les minéraux également *via* la sécrétion d'acides organiques tels que les acides oxalique, citrique, gluconique, lactique (Barker *et al.*, 1997; Chen *et al.*, 2000). Le lichen *Lecanora Atra* altère la serpentinite *via* la production d'oxalate qui forme des complexes avec le magnésium provenant du minéral (Wilson *et al.*, 1981). Le lichen produit également des composés polyphénoliques tels que les depsides et les depsidones appelés aussi acides licheniques (Mosbach, 1973), qui sont capables de former des complexes avec les cations métalliques présents dans les minéraux. Le rôle de ces composés a été mis en évidence sur des silicates tels que la biotite, ou des roches comme le granite et le basalte (Iskandar and Syers, 1972; Adamo, 2000).

Les roches colonisées par les lichens sont caractérisées par la formation d'un gradient allant de la surface du thalle à la roche non altérée. La mise en évidence de ce gradient a conduit à délimiter le lichen en plusieurs zones ayant des rôles différents dans l'altération (Figure 0.17) (Banfield *et al.*, 1999). La zone 1, située en surface, est constituée des organismes photosynthétiques. C'est le lieu de génération de l'énergie nécessaire à la symbiose et de production des acides licheniques. La zone 2 est caractérisée par un contact direct du lichen avec le substrat rocheux. Les minéraux et roches déjà fragmentés sont recouverts de polymères d'argiles issus de l'altération et d'oxy-hydroxydes néoformés. La zone 3 est le lieu où se déroulent les réactions d'altération chimique et physique. Les minéraux secondaires précipitent au niveau de cette zone. Enfin, les minéraux non altérés composent la zone 4.

2.4.5. Implication des bactéries

Les bactéries sont omniprésentes dans les sols forestiers mais toutes ne sont pas capables d'altérer les minéraux. La capacité à altérer les minéraux a été reportée pour de nombreux genres bactériens du sol mais une forte variabilité peut exister au sein de certains genres.

Les bactéries dites altérantes peuvent agir seules ou en association avec d'autres microorganismes (lichens et champignons) pour dissoudre les minéraux et acquérir leur nutriments (Uroz *et al.*, 2009a).

Même si les bactéries ne sont pas capables d'altérer de manière physique les minéraux, elles peuvent tout de même produire des protons et des molécules chélatrices jouant un rôle dans l'altération chimique.

La partie suivante détaillera l'écologie des bactéries altérantes (§3) et enfin, les mécanismes potentiellement impliqués dans l'altération des bactéries feront l'objet de la dernière partie (§4).

Nous avons vu que les insectes, les plantes, les champignons et les bactéries altèrent les minéraux. Ces organismes vivent dans le même environnement (sols forestiers) et sont en interaction plus ou moins étroite. Il est donc probable que l'altération biotique des minéraux dans les sols forestiers soit la résultante de toutes ces interactions.

3. Les bactéries altérantes

La majorité des études se sont focalisées sur les bactéries issues de la (myco)rhizosphère, soit en étudiant la capacité d'altération sur des souches modèles (Nahas, 1996; Fankem *et al.*, 2006; Hu *et al.*, 2006; Liu *et al.*, 2006, 2012; Reyes *et al.*, 2006; Crespo, 2011; Zhao *et al.*, 2013; Wu *et al.*, 2017) soit en étudiant les communautés en alliant des approches de métagénomiques et tests fonctionnels (Uroz *et al.*, 2007; Calvaruso *et al.*, 2010; Huang *et al.*, 2014; Wang *et al.*, 2014; Taktek *et al.*, 2015; Nicolitch *et al.*, 2016; Colin *et al.*, 2017a).

En absence d'une compréhension des mécanismes impliqués dans l'altération et de la démonstration d'un gène lié à cette fonction, l'approche cultivable reste la seule démarche pour étudier la fonction d'altération. Cette approche a tout de même des limites puisqu'elle ne peut être réalisée que sur une très faible proportion de bactéries dans les sols (Uroz and Frey-Klett,

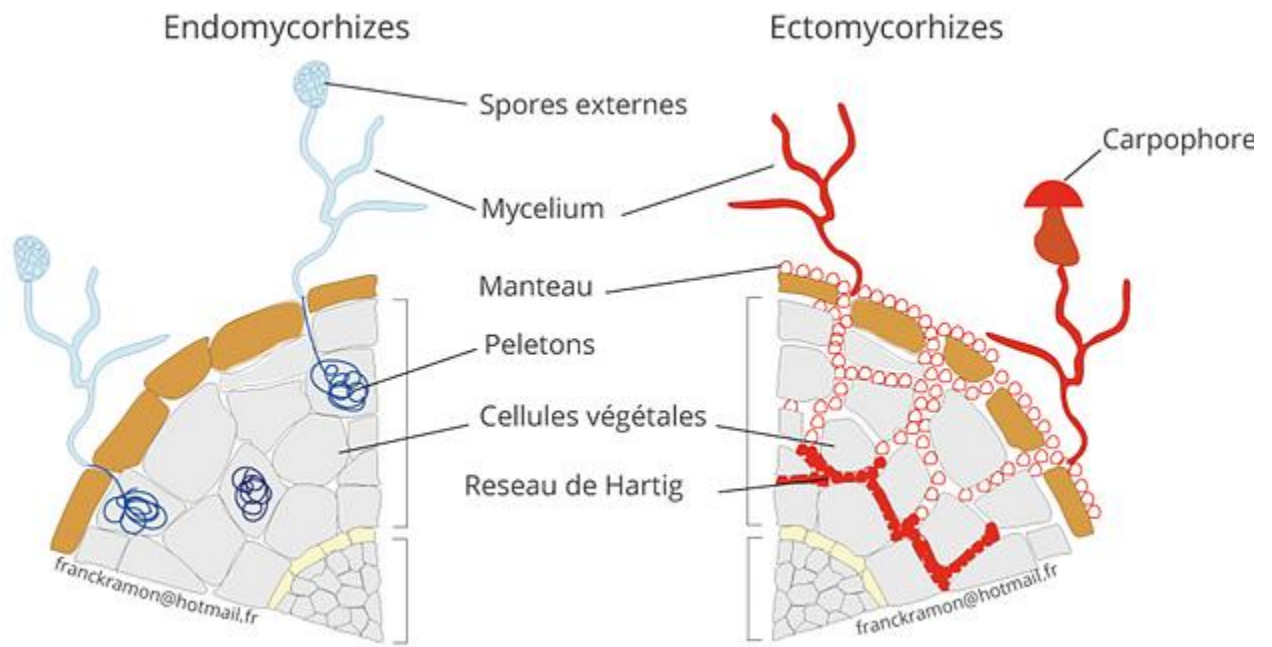


Figure 0.18 : Principaux types de mycorhizes rencontrées dans les forêts tempérées

Contrairement à l'endomycorhize où les hyphes des champignons pénètrent à l'intérieur des cellules végétales, l'ectomycorhize est caractérisée par la pénétration des hyphes entre les cellules végétales formant le réseau de Hartig. Les champignons ectomycorhiziens se développent tout autour des racines formant une sorte d'enveloppe appelé manteau fongique.

2011a). De plus, un potentiel fonctionnel mesuré *in vitro* n'est pas gage d'une réelle fonction *in vivo*.

Les communautés bactériennes altérantes sont évaluées par différents tests phénotypiques comme la solubilisation du phosphate tricalcique (TCP) qui permet d'observer les mécanismes d'acidolyse, la mobilisation du fer sur le milieu chromazurol S (CAS) qui est plutôt lié à la complexolyse ou des tests *in vitro* sur des minéraux naturels (par exemple, le test en microplaque avec biotite). Classiquement, l'évaluation de la dissolution d'un minéral se fait par mesure des éléments chimiques relargués en solution à partir des minéraux.

3.1. Les bactéries altérantes et la rhizosphère

3.1.1. La (myco)rhizosphère et ses exsudats

La rhizosphère est la zone du sol soumise à l'influence des racines (Lynch and de Leij, 2012), tandis que la mycorrhizosphère est la zone du sol sous l'influence des racines et des champignons associés (Timonen and Marschner, 2006). Au fil des millions d'années d'évolution, les plantes et les champignons ont élaboré des interactions symbiotiques étroites l'un fournissant du carbone (plante) l'autre les éléments nutritifs (principalement N et P) (Barman *et al.*, 2016; Martin *et al.*, 2016). Les champignons symbiotiques associés aux racines sont dits mycorrhiziens. L'interaction se déroule soit à l'intérieur des cellules végétales (endomycorhizes) soit les hyphes forment un réseau mycélien autour de la racine appelé manteau fongique (ectomycorhizes) (Figure 0.18) (Barman *et al.*, 2016). La grande majorité des plantes développent une interaction mycorrhizienne et notamment la quasi-totalité des arbres en forêt (Timonen and Marschner, 2006). De ce fait, le concept de rhizosphère peut être élargi au concept de mycorrhizosphère du moins dans le contexte des forêts.

L'enrichissement des bactéries du sol au niveau de la mycorrhizosphère par rapport au sol environnant (*i.e.*, le réservoir) est lié à la sécrétion d'exsudats racinaires. Les plantes peuvent excréter jusqu'à 40 % du carbone issu de la photosynthèse au niveau de leurs racines (Lynch and Whipps, 1990). Les exsudats racinaires représentent donc une source de carbone non négligeable pour les microorganismes présents. Les exsudats racinaires sont composés de carbohydrates (glucose, fructose, sucrose, maltose, galactose, rhamnose, ribose, xylose, arabinose, raffinose, oligosaccharide), d'acides aminés, d'acides organiques, de lipides ou encore de facteurs de croissance et varient en fonction de l'espèce d'arbre, de son âge et des

Tableau 0.2 : Exsudats racinaires (Curl and Truelove *et al.*, 1986b)

Types de composés	Exsudats	Plantes les plus étudiées
Sucres	Glucose, fructose, saccharose, maltose, galactose, rhamnose, ribose, xylose, arabinose, raffinose, oligosaccharide	<i>Triticum aestivum</i> , <i>Hordeum vulgare</i> , <i>Phaseolus vulgaris</i> , <i>Pinus spp.</i>
Composés aminés	Asparagine, alanine, glutamine, acide aspartique, leucine/isoleucine, sérine, acide butyrique, glycine, cystine/cystéine, méthionine, phénylalanine, tryosine, thréonine, lysine, proline, tryptophane, arginine, homosérine, cystathionine	<i>Triticum aestivum</i> , <i>Zea mays</i> , <i>Avena sativa</i> , <i>Pisum sativum</i> , <i>Phalaris spp.</i> , <i>Trifolium spp.</i> , <i>Oryza sativa</i> , <i>Gossypium barbadense</i> , <i>Lycopersicon esculentum</i> , <i>Pinus spp.</i> , <i>Robinia pseudo-acacia</i> , <i>Bouteloua gracilis</i>
Acides organiques	Tartarique, oxalique, citrique, malique, acétique, propionique, butyrique, succinique, fumarique, glycolique, valérique, malonique	<i>Triticum aestivum</i> , <i>Zea mays</i> , <i>Phaseolus vulgaris</i> , <i>Lycopersicon esculentum</i> , <i>Brassica spp.</i> , <i>Pinus spp.</i> , <i>Robinia pseudo-acacia</i>
Acides gras et stérols	Palmitique, stearique, oléique, linoléique, acide linoléique, cholestérol, campestérol, stigmastérol, sitostérol	<i>Phaseolus vulgaris</i> , <i>Arachis hypogaea</i>
Facteurs de croissance	Biotine, thiamine, niacine, pantothénate, choline, inositol, pyridoxine, acide benzoïque, acide nicotinique	<i>Triticum aestivum</i> , <i>Phalaris spp.</i> , <i>Phaseolus vulgaris</i> , <i>Pisum sativum</i> , <i>Trifolium spp.</i> , <i>Medicago spp.</i> , <i>Gossypium barbadense</i>
Nucléotides, flavonones et enzymes	Flavonone, adénine, guanine, uridine/cytidine, phosphatase, invertase, amylase, protéase, polygalacturonase	<i>Triticum aestivum</i> , <i>Zea mays</i> , <i>Pisum sativum</i> , <i>Trifolium spp.</i>

conditions environnementales (Tableau 0.2) (Curl and Truelove, 1986). Notamment, le glucose est une des sources principales de carbone dans les sols forestiers et provient des exsudats racinaires et de la décomposition de la matière organique (Grayston *et al.*, 1997; Jolivet *et al.*, 2006; Medeiros *et al.*, 2006).

Les champignons contribuent également à l'enrichissement des bactéries mycorrhizosphériques en sécrétant des composés dans l'environnement proche des hyphes et des racines mycorhizées (Nazir *et al.*, 2013). Les composés majeurs produits par les champignons sont des polysaccharides (tréhalose, chitine) et des polyols (mannitol, glycérol) (Frey *et al.*, 1997; Rangel-Castro *et al.*, 2002; Kalač, 2013). Les analyses des potentiels métaboliques *via* les plaques BIOLOG montrent que la plupart des souches isolées de la mycorrhizosphère métabolisent le tréhalose et le mannitol, ce qui n'est pas le cas de souches provenant du sol environnant (Frey *et al.*, 1997; Uroz *et al.*, 2007).

3.1.2. La rhizosphère un habitat pour les bactéries altérantes

Des bactéries altérantes ont été isolées dans la rhizosphère de différentes espèces de plantes allant des cactus (*Pachycereus pringlei*, *Stenocereus thurberi*, *Opuntia cholla*) (Puente *et al.*, 2004), et plantes du désert (*Helianthus annuus jaegeri*) (Goldstein *et al.*, 1999), aux mangroves (Vazquez *et al.*, 2000), jusqu'aux arbres (mûrier blanc, *morus alba*) (Zhang *et al.*, 2016) et arbres forestiers (chêne, hêtre, épicéa, douglas) (Calvaruso *et al.*, 2010; Collignon *et al.*, 2011; Colin *et al.*, 2017a). Récemment, la sélection de bactéries altérantes au niveau de plantes sans racines (mousses) accrochées à la roche a été démontrée (Wang *et al.*, 2021).

3.1.3. Enrichissement des bactéries altérantes au niveau de la (myco)rhizosphère

L'élaboration de collections de bactéries cultivables provenant de la mycorrhizosphère ou du sol environnant couplée aux tests fonctionnels (*i.e.*, TCP, CAS, test en microplaque) a mis en évidence un enrichissement des bactéries avec un potentiel d'altération au niveau de la mycorrhizosphère (Frey-Klett *et al.*, 2005; Uroz *et al.*, 2007; Zhang *et al.*, 2016). La fréquence des bactéries présentant un potentiel d'altération très efficace (libération de fer à partir de biotite > 1 mg/l) était plus importante dans le compartiment mycorrhizosphérique comparé au sol environnant (Calvaruso *et al.*, 2010). En ce qui concerne la solubilisation du phosphate

inorganique sur TCP, 81 % des bactéries cultivables étaient capables de solubiliser le phosphate dans le compartiment mycorrhizosphérique contre 43 % dans le sol environnant (Frey-Klett *et al.*, 2005).

Cet enrichissement fluctue en fonction de l'espèce d'arbre (Calvaruso *et al.*, 2010; Collignon *et al.*, 2011; Colin *et al.*, 2017a). La fréquence des bactéries mycorrhizosphériques efficaces dans l'altération des minéraux était plus importante sous le hêtre et le chêne par rapport à l'épicéa. De plus, contrairement au chêne et au hêtre, aucune différence significative n'a été observée entre le sol environnant et le compartiment mycorrhizosphérique en ce qui concerne la proportion des bactéries altérantes sous l'épicéa (Calvaruso *et al.*, 2010).

En général les conifères (dont l'épicéa) acidifient de manière plus importante leur rhizosphère comparé aux feuillus (dû à une absorption préférentielle de NH_4^+) (Marschner *et al.*, 1991). Cette acidification pourrait entraîner une altération des minéraux du sol. Ainsi, les conifères seraient capables d'altérer de manière plus efficace comparé aux feuillus (Calvaruso *et al.*, 2009), par conséquent la sélection de bactéries altérantes au niveau de leur rhizosphère ne serait pas aussi importante.

Il est fort probable que la sélection de bactéries altérantes par les arbres se fasse en fonction de leurs besoins nutritifs. Cela est notamment visible par l'influence des saisons sur la capacité d'altération des bactéries (§3.2.1.1).

3.2. Les facteurs qui influencent l'enrichissement des bactéries altérantes

L'altération des minéraux par les bactéries est influencée par différents facteurs. Les propriétés physico-chimiques des minéraux constituent les facteurs intrinsèques tandis que les facteurs extrinsèques sont les conditions environnementales (Brantley, 2008).

3.2.1. Facteurs extrinsèques

3.2.1.1. La saisonnalité

De manière générale, les saisons entraînent des modifications des communautés bactériennes du sol que ce soit en termes de biomasse ou de fonction (Blume *et al.*, 2002).

La saisonnalité influence l'enrichissement des bactéries altérantes au niveau de la mycorrhizosphère (par rapport au sol environnant) (Collignon *et al.*, 2011; Balland-Bolou-Bi and Poszwa, 2012). Balland *et al.* ont montré que la fréquence de bactéries altérantes était plus importante en juillet (été) par rapport à novembre (automne) et avril (printemps), cependant cette étude n'a pas pris en compte les différences entre le sol environnant et la rhizosphère (Balland-Bolou-Bi and Poszwa, 2012). Collignon *et al.* ont montrés que l'enrichissement de bactéries altérantes au niveau de la mycorrhizosphère par rapport au sol environnant était significativement plus important en février (hiver) et mai (printemps) par rapport à novembre (automne) et août (été) (Collignon *et al.*, 2011).

Il est difficile d'en tirer de grandes conclusions générales, néanmoins, on peut noter que l'enrichissement des bactéries altérantes au niveau de la rhizosphère se fait plutôt de la fin de l'hiver jusqu'à la fin de l'été. C'est également durant cette période que l'activité photosynthétique des arbres est la plus élevée augmentant ainsi la sécrétion d'exsudats racinaires (Esperschütz, Buegger, *et al.*, 2009; Esperschütz, Gattinger, *et al.*, 2009).

3.2.1.2. La disponibilité en nutriments inorganiques

La disponibilité en éléments nutritifs varie en fonction du type de sol. Les sols les plus pauvres, c'est-à-dire présentant une CEC faible et/ou un pH acide présentent une fréquence plus importante de bactéries efficaces pour altérer les minéraux comparés aux sols plus riches (CEC forte et/ou pH neutre) (Uroz *et al.*, 2014; Nicolitch *et al.*, 2016).

Pour un même sol, la disponibilité en nutriments varie en fonction de sa profondeur. Il s'avère que la proportion de bactéries efficaces pour altérer les minéraux est plus importante dans les horizons de sols présentant une faible disponibilité en nutriments (Huang *et al.*, 2014; Wang *et al.*, 2014; Nicolitch *et al.*, 2017). Les bactéries capables de mobiliser les nutriments inorganiques comme les bactéries altérantes semblent avantagées dans de tels environnements. Cette conclusion est soutenue par d'autres études qui ont analysé l'effet de l'amendement des sols sur les communautés bactériennes et particulièrement les bactéries altérantes. Une étude en microcosme a démontré qu'un apport en K ou Mg entraînait une diminution de la proportion de bactéries efficaces pour altérer les minéraux. Cet effet a été observé dès les 15 premiers jours de la fertilisation (Nicolitch *et al.*, 2019). En ce qui concerne les études *in situ*, la diminution de la fréquence des bactéries altérantes a été observée dans les sols après un apport de phosphore (Mander *et al.*, 2012; Widdig *et al.*, 2019) ou après un amendement en dolomite ($\text{CaMg}(\text{CO}_3)_2$)

par rapport au sol non amendé (Lepleux *et al.*, 2013). Cette dernière observation a été réalisée 3 ans après l'amendement démontrant son impact à court terme (Lepleux *et al.*, 2013).

A l'inverse, d'après des expériences *in situ*, l'effet de l'amendement en calcium et phosphore (Uroz *et al.*, 2011b) ou calcium et magnésium (Balland-Bolou-Bi and Poszwa, 2012) à long terme permet une augmentation de la fréquence des bactéries efficaces pour altérer les minéraux par rapport à un sol non-amendé. Les auteurs ont émis l'hypothèse que l'amendement favorise la croissance des plantes, les plantes vont donc augmenter le puisement de tous les nutriments du sol conduisant probablement à des carences secondaires (Uroz *et al.*, 2011b).

3.2.2. Facteurs intrinsèques

Les études sur des communautés bactériennes en présence de différents types de minéraux ont permis de montrer que les minéraux avaient un effet sur ces communautés.

Plus précisément, des travaux *in situ* portent sur une incubation de trois types de minéraux de composition chimique différente (*i.e.*, apatite, obsidienne, calcite) pendant 2.5 années dans le sol sous différentes essences d'arbres (*i.e.*, hêtre, taillis, pin) (Colin *et al.*, 2017a). Le potentiel d'altération des communautés bactériennes cultivables a été mesuré *via* la solubilisation du phosphate sur TCP, la mobilisation du fer sur CAS et la solubilisation de calcite. Pour toutes les essences, la proportion de bactéries altérantes était plus faible en présence de calcite (le minéral le plus altérable) comparé aux autres minéraux (*i.e.*, obsidienne, apatite). Sous le hêtre et le pin, la proportion de bactéries altérantes était la plus importante en présence d'obsidienne (le minéral le moins altérable) comparé aux autres minéraux.

Dans le même sens, une étude en microcosme a étudié l'effet de trois types de minéraux (*i.e.*, biotite, apatite, obsidienne) et de deux milieux de culture sur les communautés bactériennes (Kelly *et al.*, 2016). Un même consortium bactérien provenant d'un sol mycorhizosphérique a été incubé en présence de différents minéraux et milieux. Après 8 jours d'incubation, de forts changements au niveau des communautés bactériennes ont été observés notamment un enrichissement des gamma- et/ou beta-protéobactéries. La proportion des bactéries efficaces pour altérer les minéraux (solubilisation du phosphate) était plus importante en présence d'obsidienne par rapport à la biotite.

Ces résultats démontrent que la composition chimique et les propriétés intrinsèques des minéraux impactent les communautés bactériennes présentes et leurs fonctions. Les minéraux influencent les communautés bactériennes *via* le relargage d'éléments chimiques toxiques ou

Tableau 0.3 : Liste non-exhaustive de souches bactériennes dont l'altération des minéraux a été évaluée

Souche altérante	Minéraux testés	pH final	Dissolution du minéral	Temps incubation	Provenance	Référence
<i>Pseudomonas fluorescens BOR8</i>	Ca ₃ (PO ₄) ₂	5.00	99.80 mgPi/l	7 jours	Rhizosphère du palmier à huile (Cameroun)	Fankem <i>et al.</i> , 2006
	AlPO ₄ ·H ₂ O	4.02	37.88 mgPi/l			
	FePO ₄ ·2H ₂ O	4.32	44.65 mgPi/l			
<i>Pseudomonas fluorescens DR9</i>	Ca ₃ (PO ₄) ₂	5.40	59.46 mgPi/l	8 jours	Rhizosphère du palmier à huile (Cameroun)	Fankem <i>et al.</i> , 2006
	AlPO ₄ ·H ₂ O	5.11	92.15 mgPi/l			
	FePO ₄ ·2H ₂ O	4.92	47.59 mgPi/l			
<i>Pseudomonas fluorescens EDJ4</i>	Ca ₃ (PO ₄) ₂	4.87	58.56 mgPi/l	9 jours	Rhizosphère du palmier à huile (Cameroun)	Fankem <i>et al.</i> , 2006
	AlPO ₄ ·H ₂ O	4.69	56.94 mgPi/l			
	FePO ₄ ·2H ₂ O	5.02	51.01 mgPi/l			
<i>Bacillus mucilaginosus</i>	Phosphorite from Guiyang (GY)	5.5	120 mg/l P et K		Montagne de Tianmu (Chine)	Hu <i>et al.</i> , 2006
	Phosphorite from Jiangxi (JX)		110 mg/l P et K			
	Montmorillonite		150 mg/l P et K			
	Kaolinite		130 mg/l P et K			
	K-feldspar		150 mg/l P et K			
<i>Bacillus mucilaginosus</i>	Feldspar	5.7	0 mg/l K	5 jours	n.d.	Liu <i>et al.</i> 2006
	Mica		44.5 mg/l K			
<i>Paenibacillus sp.</i>	Roche potassique	n.d.	1.56 mg/kg Fe 0.19 mg/kg Al 55.97 mg/kg K 35.75 mg/kg Ca	7 jours	Rhizosphère du maïs (Chine)	Liu <i>et al.</i> 2012
<i>rhizobium sp. Q32</i>	Feldspath	5.9	6.6 % Si / 45.3 % K	20 jours	Trachyte potassique (Chine)	Zhao <i>et al.</i> 2013
	Biotite		12.0 % Si / 66.7 % K			
<i>Bacillus megatherium NL-7</i>	Carbonatite	4.85	6.9 % Ca 2.6 % Mg	30 jours	Mine de roche carbonatée (Chine)	Wu <i>et al.</i> 2017
<i>Azotobacter sp.</i>	Hydroxyapatite	n.d.	4.9 ratio halo/colo	7 jours	Mine de roche phosphatée (Vénézuéla)	Reyes <i>et al.</i> 2006
<i>Gluconacetobacter diazotrophicus</i>	Hydroxyapatite	2.5	98 % P	150 h	Rhizosphère canne à sucre (Brésil)	Crespo <i>et al.</i> 2011

nutritifs dans leur environnement proche. Ils ont également la capacité de tamponner le milieu en captant les protons lors de leur dissolution, c'est le cas par exemple de la calcite (formation de carbonate) (Colin *et al.*, 2017a). La zone d'influence des minéraux est appelée minéralosphère (Uroz *et al.*, 2015).

3.3. Les facteurs qui influencent l'efficacité des bactéries altérantes

3.3.1. Facteur extrinsèque : la source de carbone et d'azote

La source de carbone disponible pour les bactéries influence leur capacité à altérer les minéraux. La capacité à libérer du phosphate à partir d'une roche phosphatée par des souches de *Serratia* et de *Pseudomonas* varie en fonction de la source de carbone testée (*i.e.*, glucose, galactose, xylose, mannose, maltose, cellobiose, arabinose). En présence de glucose, *S. marcescens* libère 1.5 fois (*i.e.*, 1212 μmol) plus de phosphore comparé au galactose (*i.e.*, 836 μmol). Aucune altération n'est observée en présence d'arabinose pour les deux souches modèles (Hameeda *et al.*, 2006). De la même manière les souches de *Collimonas* et *Burkholderia* libèrent significativement plus de fer à partir de biotite en présence de glucose (jusqu'à 2.88 mg/l) par rapport au mannitol et tréhalose (jusqu'à 1.26 et 0.84 mg/l respectivement) sachant qu'aucune altération n'est mesurée en présence de gluconate (Uroz *et al.*, 2009b). De manière générale, la capacité d'altération de la majorité des souches testées est significativement plus importante en présence de glucose par rapport à d'autres sources de carbone (Nautiyal *et al.*, 2000; Hameeda *et al.*, 2006; Reyes *et al.*, 2006; Uroz *et al.*, 2007, 2009b; Patel *et al.*, 2008; Suleman *et al.*, 2018). Dans des conditions plus proches de l'environnement (expérience sur sol en pot) l'apport de glucose dans le sol augmente significativement la solubilisation du phosphate à partir d'apatite par les communautés bactériennes présentes (Brucker *et al.*, 2020).

De la même manière, la source d'azote influence la capacité d'altération des bactéries. D'après des expériences *in vitro* sur souches modèles, l'apport d'azote sous forme d'ammonium (NH_4^+) entraîne une augmentation de l'efficacité à dissoudre l'hydroxyapatite par rapport à un apport sous forme de nitrate (NO_3^-) (Abd-Alla, 1994; Reyes *et al.*, 2006). Ces résultats sont à nuancer car ils sont souche-dépendants, en effet, Nautiyal *et al.* n'ont pas observés de différences significatives dans la solubilisation du phosphate en fonction du type d'azote (*i.e.*, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, $(\text{NH}_4)_2\text{NO}_3$, KNO_3 , CaNO_3 , NaNO_3) pour leur 4 souches testées (Nautiyal *et al.*, 2000).

Les sources de carbone et d'azote influencent l'altération des minéraux par les bactéries soit en améliorant leur croissance soit en favorisant certains mécanismes. En effet, les bactéries ont

Tableau 0.3 (suite)

Souche altérante	Minéraux testés	pH final	Dissolution du minéral	Temps incubation	Provenance	Référence
<i>Bacillus subtilis</i>	roches phosphatées sédimentaires Gafsa (Tunisie)	4.8	45.37 ($\mu\text{gPO}_4^{3-}/\text{ml}$)	9 jours	sol du Brésil	Nahas <i>et al.</i> 1996
	roches phosphatées sédimentaires Araxá (Brésil)	4.8	0 ($\mu\text{gPO}_4^{3-}/\text{ml}$)			
	Roche phosphatée minière Patos de Minas (Brésil)	4.8	0 ($\mu\text{gPO}_4^{3-}/\text{ml}$)			
	Calcium phosphate dibasique (CaHPO ₄ , 2H ₂ O)	5.2	598.76 ($\mu\text{gPO}_4^{3-}/\text{ml}$)			
<i>Pseudomonas cepacia</i>	roches phosphatées sédimentaires Araxá (Brésil)	3.5	674.22 ($\mu\text{gPO}_4^{3-}/\text{ml}$)	9 jours	sol du Brésil	Nahas <i>et al.</i> 1996
	roches phosphatées sédimentaires Gafsa (Tunisie)	3.0	133.21 ($\mu\text{gPO}_4^{3-}/\text{ml}$)			
	Roche phosphatée minière Patos de Minas (Brésil)	3.2	331.88 ($\mu\text{gPO}_4^{3-}/\text{ml}$)			
	Calcium phosphate dibasique (CaHPO ₄ , 2H ₂ O)	5.6	1205.97 ($\mu\text{gPO}_4^{3-}/\text{ml}$)			
<i>Bacillus licheniformis</i>	roches phosphatées sédimentaires Araxá (Brésil)	4.8	63.93 ($\mu\text{gPO}_4^{3-}/\text{ml}$)	9 jours	sol du Brésil	Nahas <i>et al.</i> 1996
	roches phosphatées sédimentaires Gafsa (Tunisie)	4.6	7.07 ($\mu\text{gPO}_4^{3-}/\text{ml}$)			
	Roche phosphatée minière Patos de Minas (Brésil)	4.3	0 ($\mu\text{gPO}_4^{3-}/\text{ml}$)			
	Calcium phosphate dibasique (CaHPO ₄ , 2H ₂ O)	5.0	524.50 ($\mu\text{gPO}_4^{3-}/\text{ml}$)			
<i>Bacillus licheniformis</i>	roches phosphatées sédimentaires Araxá (Brésil)	4.8	109.13 ($\mu\text{gPO}_4^{3-}/\text{ml}$)	9 jours	sol du Brésil	Nahas <i>et al.</i> 1996
	roches phosphatées sédimentaires Gafsa (Tunisie)	4.7	3.04 ($\mu\text{gPO}_4^{3-}/\text{ml}$)			
	Roche phosphatée minière Patos de Minas (Brésil)	5.1	3.77 ($\mu\text{gPO}_4^{3-}/\text{ml}$)			
	Calcium phosphate dibasique (CaHPO ₄ , 2H ₂ O)	5.1	655.60 ($\mu\text{gPO}_4^{3-}/\text{ml}$)			
<i>Bacillus licheniformis</i>	roches phosphatées sédimentaires Araxá (Brésil)	4.8	84.10 ($\mu\text{gPO}_4^{3-}/\text{ml}$)	9 jours	sol du Brésil	Nahas <i>et al.</i> 1996
	roches phosphatées sédimentaires Gafsa (Tunisie)	5.0	0 ($\mu\text{gPO}_4^{3-}/\text{ml}$)			
	Roche phosphatée minière Patos de Minas (Brésil)	5.0	9.19 ($\mu\text{gPO}_4^{3-}/\text{ml}$)			
	Calcium phosphate dibasique (CaHPO ₄ , 2H ₂ O)	4.9	502.86 ($\mu\text{gPO}_4^{3-}/\text{ml}$)			
<i>Bacillus subtilis</i>	roches phosphatées sédimentaires Araxá (Brésil)	4.8	56.23 ($\mu\text{gPO}_4^{3-}/\text{ml}$)	9 jours	sol du Brésil	Nahas <i>et al.</i> 1996
	roches phosphatées sédimentaires Gafsa (Tunisie)	5.0	0 ($\mu\text{gPO}_4^{3-}/\text{ml}$)			
	Roche phosphatée minière Patos de Minas (Brésil)	4.8	6.01 ($\mu\text{gPO}_4^{3-}/\text{ml}$)			
	Calcium phosphate dibasique (CaHPO ₄ , 2H ₂ O)	4.9	649.00 ($\mu\text{gPO}_4^{3-}/\text{ml}$)			
<i>Bacillus macerans</i>	roches phosphatées sédimentaires Araxá (Brésil)	4.6	818.63 ($\mu\text{gPO}_4^{3-}/\text{ml}$)	9 jours	sol du Brésil	Nahas <i>et al.</i> 1996
	roches phosphatées sédimentaires Gafsa (Tunisie)	4.7	8.82 ($\mu\text{gPO}_4^{3-}/\text{ml}$)			
	Roche phosphatée minière Patos de Minas (Brésil)	4.6	7.32 ($\mu\text{gPO}_4^{3-}/\text{ml}$)			
	Calcium phosphate dibasique (CaHPO ₄ , 2H ₂ O)	4.9	555.89 ($\mu\text{gPO}_4^{3-}/\text{ml}$)			
<i>Bacillus megaterium</i>	roches phosphatées sédimentaires Araxá (Brésil)	4.9	36.40 ($\mu\text{gPO}_4^{3-}/\text{ml}$)	9 jours	sol du Brésil	Nahas <i>et al.</i> 1996
	roches phosphatées sédimentaires Gafsa (Tunisie)	6.2	0 ($\mu\text{gPO}_4^{3-}/\text{ml}$)			
	Roche phosphatée minière Patos de Minas (Brésil)	6.2	0 ($\mu\text{gPO}_4^{3-}/\text{ml}$)			
	Calcium phosphate dibasique (CaHPO ₄ , 2H ₂ O)	4.8	500.95 ($\mu\text{gPO}_4^{3-}/\text{ml}$)			

souvent une source préférentielle de carbone et d'azote. Le glucose est lié à un métabolisme acidifiant tandis que l'ammonium favorise la production de proton *via* le mécanisme d'extrusion de proton (Wu *et al.*, 2008). Le glucose et l'ammonium sont donc des substrats pouvant potentiellement mener à une acidolyse des minéraux.

3.3.2. Facteur intrinsèque : le type de minéral

Pour comparer l'efficacité d'altération des minéraux par une même souche bactérienne en fonction de différents types de minéraux, il est indispensable de calculer le taux de dissolution. En effet, le taux de dissolution permet de rapporter la quantité d'éléments chimiques libérés à la teneur dans le minéral. Cette mesure permet donc de comparer la dissolution de minéraux qui peuvent ne pas avoir la même composition chimique (ils doivent néanmoins avoir la même surface d'échange, *i.e.*, calibration de la taille). Cependant, la plupart des études traitant d'altération des minéraux par les bactéries s'intéressent à quelques éléments chimiques et le taux de dissolution n'est pas toujours calculé (Tableau 0.3).

Il est parfois possible d'après les données fournies dans la littérature de calculer *a posteriori* le taux de dissolution. Par exemple, la souche de *Rhizobium sp.* Q32 relargue 1.3 mmol/l de K en présence de biotite ou de feldspath mais cela correspond à un taux de dissolution 1.5 fois plus élevé pour la biotite comparé au feldspath (Tableau 0.3 ; (Zhao *et al.*, 2013)). Dans ce cas, la souche de *Rhizobium* altère plus efficacement la biotite que le feldspath.

3.3.3. Quels sont les genres et espèces bactériennes efficaces pour altérer les minéraux ?

La création de collections de bactéries cultivables à partir de sols ainsi que des méthodes de séquençage et criblage fonctionnel ont permis de lier genres et fonction. Ces études de communautés ont d'abord souligné que toutes les bactéries n'étaient pas efficaces pour altérer les minéraux dans les conditions testées. Elles ont également fait ressortir différents genres bactériens particulièrement efficaces pour altérer les minéraux dont *Arthrobacter*, *Burkholderia-Caballeronia-Paraburkholderia*, *Collimonas*, *Janthinobacterium*, *Kitasatospora*, *Leifsonia*, *Polaromonas*, *Streptomyces* (Uroz *et al.*, 2007; Calvaruso *et al.*, 2010; Frey *et al.*, 2010; Huang *et al.*, 2014). Le Tableau 0.4 répertorie de manière non exhaustive les genres bactériens capables d'altérer les minéraux dans les sols (Uroz *et al.*, 2007;

Tableau 0.4 : Les genres bactériens altérants identifiés *via* des études sur des communautés bactériennes provenant de différents environnements

Genre bactérien altérant	Nombre retrouvé	Minéraux testés	Provenance	Référence
<i>Pseudomonas</i>	15	Tricalcium phosphate	Rhizosphère de noyer (Chine)	Yu <i>et al.</i> 2011
<i>Bacillus</i>	9	Tricalcium phosphate	Rhizosphère de noyer (Chine)	Yu <i>et al.</i> 2011
<i>Stenotrophomonas</i>	3	Tricalcium phosphate	Rhizosphère de noyer (Chine)	Yu <i>et al.</i> 2011
<i>Acinetobacter</i>	2	Tricalcium phosphate	Rhizosphère de noyer (Chine)	Yu <i>et al.</i> 2011
<i>Bacillus</i>	206	Biotite	Sol de Yanting (Chine)	Huang <i>et al.</i> 2014
<i>Pseudomonas</i>	44	Biotite	Sol de Yanting (Chine)	Huang <i>et al.</i> 2014
<i>Pantoea</i>	32	Biotite	Sol de Yanting (Chine)	Huang <i>et al.</i> 2014
<i>Acinetobacter</i>	16	Biotite	Sol de Yanting (Chine)	Huang <i>et al.</i> 2014
<i>Enterobacter</i>	16	Biotite	Sol de Yanting (Chine)	Huang <i>et al.</i> 2014
<i>Paenibacillus</i>	12	Biotite	Sol de Yanting (Chine)	Huang <i>et al.</i> 2014
<i>Ensifer</i>	9	Biotite	Sol de Yanting (Chine)	Huang <i>et al.</i> 2014
<i>Curtobacterium</i>	8	Biotite	Sol de Yanting (Chine)	Huang <i>et al.</i> 2014
<i>Sphingomonas</i>	7	Biotite	Sol de Yanting (Chine)	Huang <i>et al.</i> 2014
<i>Exiguobacterium</i>	4	Biotite	Sol de Yanting (Chine)	Huang <i>et al.</i> 2014
<i>Rhizobium</i>	4	Biotite	Sol de Yanting (Chine)	Huang <i>et al.</i> 2014
<i>Serratia</i>	4	Biotite	Sol de Yanting (Chine)	Huang <i>et al.</i> 2014
<i>Microbacterium</i>	3	Biotite	Sol de Yanting (Chine)	Huang <i>et al.</i> 2014
<i>Massilia</i>	2	Biotite	Sol de Yanting (Chine)	Huang <i>et al.</i> 2014
<i>Arthrobacter</i>	91	Biotite	Sol de Changshu (Chine)	Huang <i>et al.</i> 2014
<i>Pseudomonas</i>	74	Biotite	Sol de Changshu (Chine)	Huang <i>et al.</i> 2014
<i>Bacillus</i>	64	Biotite	Sol de Changshu (Chine)	Huang <i>et al.</i> 2014
<i>Pantoea</i>	15	Biotite	Sol de Changshu (Chine)	Huang <i>et al.</i> 2014
<i>Curtobacterium</i>	6	Biotite	Sol de Changshu (Chine)	Huang <i>et al.</i> 2014
<i>Paenibacillus</i>	6	Biotite	Sol de Changshu (Chine)	Huang <i>et al.</i> 2014
<i>Rhizobium</i>	5	Biotite	Sol de Changshu (Chine)	Huang <i>et al.</i> 2014
<i>Bacillus</i>	29	Feldspath	Sol de la montagne de Yuexi (Chine)	Wang <i>et al.</i> 2014
<i>Burkholderia</i>	14	Feldspath	Sol de la montagne de Yuexi (Chine)	Wang <i>et al.</i> 2014
<i>Pseudomonas</i>	9	Feldspath	Sol de la montagne de Yuexi (Chine)	Wang <i>et al.</i> 2014
<i>Arthrobacter</i>	7	Feldspath	Sol de la montagne de Yuexi (Chine)	Wang <i>et al.</i> 2014
<i>Paenibacillus</i>	3	Feldspath	Sol de la montagne de Yuexi (Chine)	Wang <i>et al.</i> 2014
<i>Curtobacterium</i>	2	Feldspath	Sol de la montagne de Yuexi (Chine)	Wang <i>et al.</i> 2014
<i>Rhizobium</i>	2	Feldspath	Sol de la montagne de Yuexi (Chine)	Wang <i>et al.</i> 2014
<i>Rhodococcus</i>	2	Feldspath	Sol de la montagne de Yuexi (Chine)	Wang <i>et al.</i> 2014
<i>Klebsiella</i>	17	Fledspath potassique	Rhizosphère de plants de tabac (Chine)	Zhang <i>et al.</i> 2014
<i>Enterobacter</i>	5	Fledspath potassique	Rhizosphère de plants de tabac (Chine)	Zhang <i>et al.</i> 2014
<i>Arthrobacter</i>	17	Fledspath potassique	Rhizosphère de mûrier blanc (Chine)	Zhang <i>et al.</i> 2016
<i>Bacillus</i>	7	Fledspath potassique	Rhizosphère de mûrier blanc (Chine)	Zhang <i>et al.</i> 2016
<i>Stenotrophomonas</i>	7	Fledspath potassique	Rhizosphère de mûrier blanc (Chine)	Zhang <i>et al.</i> 2016
<i>Acinetobacter</i>	3	Fledspath potassique	Rhizosphère de mûrier blanc (Chine)	Zhang <i>et al.</i> 2016
<i>Burkholderia</i>	3	Fledspath potassique	Rhizosphère de mûrier blanc (Chine)	Zhang <i>et al.</i> 2016
<i>Brevibacillus</i>	2	Fledspath potassique	Rhizosphère de mûrier blanc (Chine)	Zhang <i>et al.</i> 2016
<i>Ensifer</i>	2	Fledspath potassique	Rhizosphère de mûrier blanc (Chine)	Zhang <i>et al.</i> 2016
<i>Pseudomonas</i>	2	Fledspath potassique	Rhizosphère de mûrier blanc (Chine)	Zhang <i>et al.</i> 2016
<i>Arthrobacter</i>	17	Fledspath potassique	Sol non-rhizosphérique (Chine)	Zhang <i>et al.</i> 2016
<i>Pseudomonas</i>	9	Fledspath potassique	Sol non-rhizosphérique (Chine)	Zhang <i>et al.</i> 2016
<i>Ensifer</i>	3	Fledspath potassique	Sol non-rhizosphérique (Chine)	Zhang <i>et al.</i> 2016
<i>Brevibacillus</i>	2	Fledspath potassique	Sol non-rhizosphérique (Chine)	Zhang <i>et al.</i> 2016
<i>Cupriavidus</i>	2	Fledspath potassique	Sol non-rhizosphérique (Chine)	Zhang <i>et al.</i> 2016

Calvaruso *et al.*, 2010; Frey *et al.*, 2010; Yu *et al.*, 2011; Mander *et al.*, 2012; Lepleux *et al.*, 2013; Huang *et al.*, 2014; Wang *et al.*, 2014; Zhang and Kong, 2014; Taktek *et al.*, 2015; Nicolitch *et al.*, 2016, 2019; Zhang *et al.*, 2016; Widdig *et al.*, 2019; Colin *et al.*, 2017a). Dans les sols pauvres en nutriments et acides des forêts tempérées, deux genres bactériens mycorrhizosphériques particulièrement efficaces pour altérer les minéraux ont été mis en évidence : les genres *Burkholderia* et *Collimonas* (Collignon *et al.*, 2011; Zhang *et al.*, 2016). Cependant, la fonction d'altération des minéraux n'est pas toujours conservée au sein du genre. De grandes disparités sont observées pour les *Arthrobacter*, *Burkholderia* ou les *Janthinobacterium* (Calvaruso *et al.*, 2010). A l'inverse, jusqu'à ce jour, l'altération des minéraux est un trait fonctionnel pour les *Collimonas* (Uroz *et al.*, 2009b).

3.4. Les bactéries altérantes, des bactéries promotrices de la croissance des plantes

On pense que certaines bactéries rhizosphériques sont sélectionnées par les plantes *via* les exsudats racinaires pour leur capacité à promouvoir la croissance de ces plantes (Plant Growth Promoting Rhizobacteria (PGPR)). En échange du carbone fourni, les bactéries ont développé une grande variété de mécanismes bénéfiques pour les plantes. En effet, les bactéries sont capables de produire des facteurs de croissance, de lutter contre les agents pathogènes, de stimuler les mécanismes de défenses de la plante, ou de fournir les nutriments inorganiques nécessaires à leur croissance (Berg, 2009; Lynch and de Leij, 2012; Gupta *et al.*, 2015). Ainsi, la capacité des bactéries à altérer les minéraux et rendre leur contenu chimique disponible pour les plantes peut être considéré comme une fonction PGPR.

3.4.1. Application des bactéries altérantes

La capacité à dissoudre les minéraux est d'un grand intérêt pour la filière agricole (Teotia *et al.*, 2016; Ribeiro *et al.*, 2020). Les sols agricoles sont souvent carencés en phosphore (particulièrement en Inde (Sanyal *et al.*, 2015)), qui est considéré comme le second élément nutritif (derrière l'azote) nécessaire à la croissance des plantes. Pour pallier à cette carence, les chercheurs se sont tournés vers l'étude de l'utilisation de bactéries capables de solubiliser le phosphate inorganique (Pi) (Gyaneshwar *et al.*, 2002; Harvey *et al.*, 2009; Khan *et al.*, 2009; Sharma *et al.*, 2013). La majorité des études se sont focalisées sur des bactéries isolées du sol

Tableau 0.4 (suite)

Genre bactérien altérant	Nombre retrouvé	Minéraux testés	Provenance	Référence
<i>Burkholderia</i>	N.D.	Biotite	Mycorhizosphère du chêne (France)	Uroz <i>et al.</i> 2007
<i>Collimonas</i>	N.D.	Biotite	Mycorhizosphère du chêne (France)	Uroz <i>et al.</i> 2007
<i>Pseudomonas</i>	N.D.	Biotite	Mycorhizosphère du chêne (France)	Uroz <i>et al.</i> 2007
<i>Sphingomonas</i>	N.D.	Biotite	Mycorhizosphère du chêne (France)	Uroz <i>et al.</i> 2007
<i>Collimonas</i>	N.D.	Biotite	Mycorhizosphère du chêne et de l'épicéa (France)	Calvaruso <i>et al.</i> 2010
<i>Burkholderia</i>	N.D.	Biotite	Mycorhizosphère du chêne et de l'épicéa (France)	Calvaruso <i>et al.</i> 2010
<i>Burkholderia</i>	65	Tricalcium phosphate	Rhizosphère du chêne (France)	Lepleux <i>et al.</i> 2013
<i>Collimonas</i>	11	Tricalcium phosphate	Rhizosphère du chêne (France)	Lepleux <i>et al.</i> 2013
<i>Pseudomonas</i>	5	Tricalcium phosphate	Rhizosphère du chêne (France)	Lepleux <i>et al.</i> 2013
<i>Paenibacillus</i>	42	Tricalcium phosphate	Mycorhizosphère du hêtre (France)	Nicolitch <i>et al.</i> 2016
<i>Streptomyces</i>	41	Tricalcium phosphate	Mycorhizosphère du hêtre (France)	Nicolitch <i>et al.</i> 2016
<i>Burkholderia</i>	34	Tricalcium phosphate	Mycorhizosphère du hêtre (France)	Nicolitch <i>et al.</i> 2016
<i>Collimonas</i>	16	Tricalcium phosphate	Mycorhizosphère du hêtre (France)	Nicolitch <i>et al.</i> 2016
<i>Arthrobacter</i>	12	Tricalcium phosphate	Mycorhizosphère du hêtre (France)	Nicolitch <i>et al.</i> 2016
<i>Kitasatospora</i>	11	Tricalcium phosphate	Mycorhizosphère du hêtre (France)	Nicolitch <i>et al.</i> 2016
<i>Burkholderia</i>	75	Tricalcium phosphate	Rhizosphère hêtre, taillis, pin (France)	Colin <i>et al.</i> 2017
<i>Rhizobium</i>	45	Tricalcium phosphate	Rhizosphère hêtre, taillis, pin (France)	Colin <i>et al.</i> 2017
<i>Collimonas</i>	30	Tricalcium phosphate	Rhizosphère hêtre, taillis, pin (France)	Colin <i>et al.</i> 2017
<i>Arthrobacter</i>	25	Tricalcium phosphate	Rhizosphère hêtre, taillis, pin (France)	Colin <i>et al.</i> 2017
<i>Sphingomonas</i>	15	Tricalcium phosphate	Rhizosphère hêtre, taillis, pin (France)	Colin <i>et al.</i> 2017
<i>Leifsonia</i>	12	Tricalcium phosphate	Rhizosphère hêtre, taillis, pin (France)	Colin <i>et al.</i> 2017
<i>Pseudomonas</i>	12	Tricalcium phosphate	Rhizosphère hêtre, taillis, pin (France)	Colin <i>et al.</i> 2017
<i>Streptomyces</i>	6	Tricalcium phosphate	Rhizosphère hêtre, taillis, pin (France)	Colin <i>et al.</i> 2017
<i>Collimonas</i>	41	Tricalcium phosphate	Sol forestier (France)	Nicolitch <i>et al.</i> 2019
<i>Burkholderia</i>	20	Tricalcium phosphate	Sol forestier (France)	Nicolitch <i>et al.</i> 2019
<i>Arthrobacter</i>	N.D.	Granite	Damma glacier Alpes (Suisse)	Frey <i>et al.</i> 2010
<i>Janthinobacterium</i>	N.D.	Granite	Damma glacier Alpes (Suisse)	Frey <i>et al.</i> 2010
<i>Leifsonia</i>	N.D.	Granite	Damma glacier Alpes (Suisse)	Frey <i>et al.</i> 2010
<i>Polaromonas</i>	N.D.	Granite	Damma glacier Alpes (Suisse)	Frey <i>et al.</i> 2010
<i>Enterobacteriaceae</i>	~12	Tricalcium phosphate	Sol ou rhizosphère de ray-grass (NZ)	Mander <i>et al.</i> 2012
<i>Micrococcaceae</i>	~12	Tricalcium phosphate	Sol ou rhizosphère de ray-grass (NZ)	Mander <i>et al.</i> 2012
<i>Pseudomonodaceae</i>	~12	Tricalcium phosphate	Sol ou rhizosphère de ray-grass (NZ)	Mander <i>et al.</i> 2012
<i>Sphingomonadaceae</i>	~10	Tricalcium phosphate	Sol ou rhizosphère de ray-grass (NZ)	Mander <i>et al.</i> 2012
<i>Microbacteriaceae</i>	~10	Tricalcium phosphate	Sol ou rhizosphère de ray-grass (NZ)	Mander <i>et al.</i> 2012
<i>Rhizobiaceae</i>	~5	Tricalcium phosphate	Sol ou rhizosphère de ray-grass (NZ)	Mander <i>et al.</i> 2012
<i>Sphingobacteriaceae</i>	~5	Tricalcium phosphate	Sol ou rhizosphère de ray-grass (NZ)	Mander <i>et al.</i> 2012
<i>Burkholderiaceae</i>	~2	Tricalcium phosphate	Sol ou rhizosphère de ray-grass (NZ)	Mander <i>et al.</i> 2012
<i>Bacillus</i>	51	Tricalcium phosphate	Mycorhizosphère ou hyphosphère (Canada)	Taktek <i>et al.</i> 2015
<i>Burkholderia</i>	38	Tricalcium phosphate	Mycorhizosphère ou hyphosphère (Canada)	Taktek <i>et al.</i> 2015
<i>Rahnella</i>	4	Tricalcium phosphate	Mycorhizosphère ou hyphosphère (Canada)	Taktek <i>et al.</i> 2015
<i>Ewingella</i>	2	Tricalcium phosphate	Mycorhizosphère ou hyphosphère (Canada)	Taktek <i>et al.</i> 2015
<i>Pseudomonas</i>	2	Tricalcium phosphate	Mycorhizosphère ou hyphosphère (Canada)	Taktek <i>et al.</i> 2015
<i>Rhizobium</i>	1	Tricalcium phosphate	Mycorhizosphère ou hyphosphère (Canada)	Taktek <i>et al.</i> 2015
<i>Pseudomonas</i>	56	Tricalcium phosphate	Sol prairie (Afrique du Sud, USA, UK)	Widdig <i>et al.</i> 2019
<i>Enterobacterales</i>	50	Tricalcium phosphate	Sol prairie (Afrique du Sud, USA, UK)	Widdig <i>et al.</i> 2019
<i>Paenibacillus</i>	14	Tricalcium phosphate	Sol prairie (Afrique du Sud, USA, UK)	Widdig <i>et al.</i> 2019

et efficaces pour dissoudre les minéraux phosphatés. Ces souches bactériennes étaient alors sélectionnées pour tester leur capacité à augmenter la croissance des plantes. Notamment, plusieurs genres bactériens ont été testés *Bacillus*, *Burkholderia*, *Staphylococcus*, *Pseudomonas*, *Pantoea*, *Paenibacillus*, *Enterobacter*, *Serratia*... Des études *in vitro* en tube stérile (Azaroual *et al.*, 2020), en pot sur sol stérile (Kundu and Gaur, 1980; Ditta *et al.*, 2018; Borgi *et al.*, 2020; Zineb *et al.*, 2020) ou non-stérile (Kundu and Gaur, 1984; Gupta *et al.*, 2011; Selvakumar *et al.*, 2013; Walpola and Yoon, 2013; Martins da Costa *et al.*, 2015), ou directement en champs (Datta *et al.*, 1982; Rajapaksha and Senanayake, 2011; Kaur and Reddy, 2015) ont été réalisés. Ces études ont permis de montrer que certaines souches solubilisatrices de phosphate permettaient l'augmentation de la croissance, de l'acquisition de Pi, du rendement ou de la biomasse de différentes plantes d'intérêt agricole comme le blé, le riz, la pomme de terre, le coton, les lentilles, le maïs, le pois chiche, la luzerne, la fève, la tomate... Néanmoins, il faut tout de même souligner que les souches testées positives pour solubiliser le phosphate n'étaient pas toutes capables de promouvoir la croissance des plantes. De plus, nous avons vu que les bactéries pouvaient promouvoir la croissance des plantes par différents mécanismes et les études présentées ci-dessus ne démontrent pas réellement l'effet de la fonction d'altération des minéraux dans la fonction PGPR.

D'autre part, nous avons vu dans cette introduction que les sols forestiers des régions tempérées étaient pauvres en nutriments inorganiques, dues aux propriétés des sols (acides et rocheux) et aussi à l'absence d'amendement dans les forêts exploitées. C'est dans ce contexte qu'ont été développées des études sur la capacité des bactéries altérantes à promouvoir la croissance des arbres (Tableau 0.5). Leyval *et al.* ont, par des tests en pots non-stériles, inoculés des plants de hêtre et de pin avec une souche d'*Agrobacterium radiobacter* ou un champignon mycorhizien (*Laccaria bicolor*) ou en combinant les deux. Les pots contenaient de la phlogopite qui représentait la seule source de P, Fe, Mg et Al. Les auteurs ont pu montrer que l'inoculation seule d'*Agrobacterium* permettait une augmentation de la masse sèche des feuilles, des racines et du tronc. L'acquisition de potassium, phosphore, aluminium, magnésium et fer était également augmentée en présence des bactéries par rapport aux plants non-inoculés (Leyval and Berthelin, 1989; Leyval *et al.*, 1990). Dans le même sens, Calvaruso *et al.* ont testé la capacité de différentes souches de *Burkholderia* (efficaces pour altérer les minéraux *in vitro*) à promouvoir la croissance du pin sylvestre *via* l'altération de la biotite. Ces expériences en pots non-stériles ont montré qu'une seule souche sur les trois testées (*Caballeronia mineralivorans*

Tableau 0.5 : Activité promotrice de la croissance des arbres par certaines souches bactériennes altérantes

Souche bactérienne	Arbre	Mesures	Résultats	Référence
<i>Agrobacterium radiobacter</i>	<i>Fagus silvatica</i> (hêtre)	Masse sèche ; minéralomasse	<i>Agrobacterium radiobacter</i> augmente significativement la croissance et l'acquisition de P, Mg, Al, K et Fe des racines et tiges du hêtre comparé à un plant non-inoculé	Leyval <i>et al.</i> 1989
<i>Agrobacterium radiobacter</i> <i>Agrobacterium sp.</i>	<i>Fagus silvatica</i> (hêtre) et <i>Pinus</i> <i>sylvestris</i> (pin)	Masse sèche ; minéralomasse	La présence des souches bactériennes augmente la mobilisation de Mg, Fe et Al par le hêtre et Mg et Fe par le pin (à partir de l'altération de la phlogopite)	Leyval <i>et al.</i> 1990
<i>Burkholderia glathei</i> PMB1(7) <i>Burkholderia glathei</i> PML1(4) <i>Caballeronia mineralivorans</i> PML1(12)	<i>Pinus sylvestris</i> (pin)	Minéralomasse	Quantité de K et Mg relargué par l'altération de la biotite et assimilé par la plante significativement plus important uniquement en présence de PML1(12) comparé au contrôle non inoculé	Calvaruso <i>et al.</i> 2006
<i>Caballeronia mineralivorans</i> PML1(12) <i>Collimonas pratensis</i> PMB3(1)	<i>Pinus sylvestris</i> (pin)	Biomasse ; minéralomasse	Biomasse racinaire significativement plus importante en présence de PMB3(1) coinoculé avec le champignon ectomycorhizien <i>S. Citrinum</i> comparé au plant non-inoculé	Koele <i>et al.</i> 2009
<i>Pseudomonas chlororaphis</i> <i>Pseudomonas fluorescens</i> <i>Bacillus cereus</i>	<i>Juglans siggillata</i> (noyer)	Taille des plantes ; masse sèche ; acquisition de nutriments	Les deux souches de <i>Pseudomonas</i> améliorent la croissance des plants de façon significative comparé au plant non-inoculé	Yu <i>et al.</i> 2011
<i>Pantoea roadsii</i> HRP2 <i>Paraburkholderia caffeinilytica</i> JRP13 <i>Pseudomonas grimontii</i> JRP22	<i>Cunninghamia</i> <i>lanceolata</i> (Araucaria de Chine)	Taille ; biomasse ; diamètre ; acquisition de nutriments	Toutes les souches entraînent une augmentation significative de la taille des plants ainsi que l'acquisition de nutriments (N, P, K, Mg , Fe)	Chen <i>et al.</i> 2021

PML1(12)) permettait un apport significativement plus important de magnésium et potassium à partir de biotite à la plante (Calvaruso *et al.*, 2006). Enfin, Koele *et al.* ont tenté d'évaluer l'activité PGPR sur le pin sylvestre de deux souches bactériennes *Caballeronia mineralivorans* PML1(12) et *Collimonas pratensis* PMB3(1) associées ou non à deux souches fongiques mycorhiziennes (*Laccaria bicolor* et *Scleroderma citrinum*). La biotite représentait la seule source de magnésium et potassium de l'expérience. Les traitements inoculés avec les souches bactériennes n'ont pas permis d'observer dans cette étude de différences significatives dans l'acquisition de potassium et magnésium par la plante comparativement aux plants non-inoculés. Cependant, la biomasse sèche était significativement plus importante lorsque le pin était inoculé avec le champignon *S. citrinum* et PMB3(1). Les auteurs suggèrent que les souches bactériennes ne se seraient pas maintenues dans le système à flux continu et particulièrement la souche PMB3(1) en absence de champignons.

3.4.2. Les limites

La difficulté des études présentées ci-dessus est de savoir si l'effet promoteur de croissance est réellement dû à la solubilisation issue des minéraux ou à d'autres capacités de biocontrôles que peuvent avoir certaines bactéries. **Enfinement, en prenant en compte cet aspect, il n'existe pas à l'heure actuelle d'études évaluant la capacité PGP via la dissolution des minéraux par une souche bactérienne altérante comparé à une souche bactérienne non-altérante ou un mutant.**

Ces expérimentations *in vitro*, en serre ou en champs ont révélé des effets variables de l'utilisation de bactéries altérantes pour promouvoir la croissance des plantes. Le premier facteur d'échec de cette pratique est la capacité des bactéries inoculées à se maintenir dans leur nouvel environnement. Les souches sélectionnées doivent donc être adaptées aux conditions environnementales (propriétés du sol, espèce de plante...), être capables de coloniser la rhizosphère et de survivre aux interactions avec les communautés de microorganismes indigènes (Gyaneshwar *et al.*, 2002). De ce fait, il est indispensable de choisir les bactéries PGP les mieux adaptées.

3.4.3. Les avantages de l'utilisation des bactéries altérantes et minéraux pour l'amendement des sols

L'emploi de minéraux et roches en agriculture fait le sujet d'études visant à remplacer les fertilisants traditionnels au profit de poudres de roches inoculées avec des bactéries altérantes (Teotia *et al.*, 2016; Schueler *et al.*, 2021). L'avantage de cette méthode est d'augmenter la durabilité de la fertilisation comparativement aux fertilisants traditionnels (Fayiga and Nwoke, 2016). L'altération des minéraux contribue également à la diminution du réchauffement climatique en séquestrant le carbone (formation de CaCO_3 dans le cas d'amendements calcaires). Enfin, elle permet de diminuer l'importation de fertilisants favorisant l'économie locale (Ribeiro *et al.*, 2020).

4. Les mécanismes moléculaires impliqués dans l'altération

A ce jour, différents mécanismes moléculaires impliqués dans l'altération des minéraux ont été mis en évidence ou sont suspectés. De plus, les démonstrations réalisées ne prennent en compte que relativement peu de genres bactériens. Les bactéries pourraient donc altérer les minéraux *via* différents mécanismes opérant à distance et/ou avec un contact entre la cellule et le minéral. Les plus connus sont l'acidolyse (effet de l'acidification), la complexolyse (effet de la chélation) et l'oxydo-réduction (changement d'état lié à un gain ou une perte d'électrons) (Robert and Berthelin, 1986). Une même souche bactérienne pourrait potentiellement mettre en place plusieurs de ces mécanismes et ce en fonction des conditions environnementales.

La figure 0.19 présente les différents mécanismes moléculaires démontrés ou suspectés dans l'altération des minéraux et qui sont détaillés dans cette section.

4.1. Acidolyse et métabolisme

L'acidolyse est considérée comme le mécanisme principal de l'altération des minéraux (Robert and Berthelin, 1986; Uroz *et al.*, 2007). Cette acidolyse est liée à la capacité des bactéries à produire des molécules acidifiantes telles que des acides organiques et inorganiques, et des protons.

Selon la source de carbone, l'acidification d'une souche bactérienne n'a pas la même intensité. Par exemple, la souche de *Serratia marcescens* acidifie le milieu passant d'un pH 8 à 3.2 en

présence de glucose, à pH 3.9 avec du galactose et à pH 4.6 avec du xylose (Hameeda *et al.*, 2006). La souche de *Collimonas pratensis* PMB3(1) acidifie le milieu passant d'un pH de 6.5 à 3.1 en présence de glucose, à pH 4.4 avec du mannitol, à pH 5.1 avec du tréhalose (Uroz *et al.*, 2009b). De façon intéressante, en présence de glucose les bactéries acidifient de manière plus importante comparativement aux autres sources de carbone. Cela est probablement dû à une plus grande quantité de protons produits en présence de glucose ainsi que des acides organiques différents en fonction des voies métaboliques. De nombreux processus physiologiques conduisent à cette production, mais le lien avec la capacité à altérer les minéraux reste à démontrer.

Le glucose est une des sources principales de carbone dans le sol, de plus, les bactéries sont plus efficaces pour altérer les minéraux en présence de glucose par rapport à d'autres sources de carbone (§3.3.1), la section suivante se focalisera donc sur les différentes voies métaboliques du glucose.

4.1.1. Les voies métaboliques du glucose

Le criblage de nombreuses souches a révélé que toutes les bactéries consommatrices de glucose et capables de croître ne sont pas altérantes (exemple de la souche de *Burkholderia* PN3(3) (Uroz *et al.*, 2009b)). Cela amène plusieurs questions : Quel est le lien entre le glucose et l'altération des minéraux ? Pourquoi les bactéries qui utilisent le glucose ne sont pas obligatoirement altérantes ? La réponse à ces questions se trouve peut-être au niveau des voies métaboliques utilisées par les différentes bactéries pour métaboliser le glucose.

Il existe différentes voies métaboliques du glucose : la voie Embden-Meyerhof-Parnas (EMP, glycolyse), la voie d'Entner Doudoroff. (ED), la voie des pentoses phosphates (PP) ou la voie d'oxydation directe du glucose (OD) (Jurtshuk, 1996). Toutes ces voies métaboliques ne sont pas retrouvées chez toutes les bactéries. En effet, certaines voies sont préférentiellement retrouvées dans certains genres ou espèces (Fuhrer *et al.*, 2005). Ces différentes voies ne sont néanmoins pas équivalentes en termes d'enzymes impliquées, d'énergie produite (ATP, pyruvate) et de production de biomasse. A titre d'exemple, la voie ED nécessite 3 à 5 fois moins d'enzyme que la voie EMP (Flamholz *et al.*, 2013), mais produit moins d'énergie. La voie OD du glucose produit encore moins d'énergie que la voie EMP mais conduit à une production massive de protons et acides organiques. Ces voies ne sont pas complètement indépendantes et

peuvent s'interconnecter selon les conditions (Peekhaus and Conway, 1998; Fuhrer *et al.*, 2005; Silva *et al.*, 2017) (Figure 0.19). Mais à l'heure actuelle, les déterminants génétiques de l'utilisation d'une voie plutôt qu'une autre ne sont pas encore élucidés. Enfin, la localisation cellulaire de ces voies n'est pas la même, puisque l'EMP, l'ED et le PP sont cytoplasmiques alors que la voie d'oxydation directe du glucose (OD) est périplasmique.

4.1.2. La voie d'oxydation directe du glucose

La voie OD du glucose conduit à la production d'acide gluconique (et dérivés) et de protons au niveau du périplasma. L'essentiel des produits (gluconate (GA) ; 2-keto-gluconate (2KGA) et protons (H⁺)) de cette oxydation est libéré dans le milieu extérieur, contribuant à une forte acidification de l'environnement proche. La voie OD du glucose est la seule voie qui a été expérimentalement liée à la capacité d'altération des minéraux par les bactéries. La création de mutants a révélé le rôle clé d'un type de glucose déshydrogénase (GDH). Cette enzyme est impliquée dans la conversion du glucose en gluconate, réaction qui produit des protons (Goldstein, 1995; Illmer and Schinner, 1995; Sashidhar and Podile, 2010). La mutation du gène codant la GDH conduit à une incapacité à altérer les minéraux pour *Gluconacetobacter* ou *Azotobacter* (Intorne *et al.*, 2009; Crespo, 2011; Wang *et al.*, 2020). Le lien entre l'activité de la GDH et l'altération des minéraux a été démontré pour divers genre bactériens : *Enterobacter* (Gyaneshwar *et al.*, 1999; Tripura *et al.*, 2007), *Pseudomonas* (Miller *et al.*, 2010; Wang *et al.*, 2020), *Gluconobacter* (Crespo, 2011) et *Azotobacter* (Sashidhar and Podile, 2009).

4.1.3. Les glucose déshydrogénases

Les bactéries possèdent différents types de GDHs qui diffèrent en fonction de leur cofacteur (pyrroloquinoléine quinone (PQQ), nicotinamide adénine dinucléotide (NAD) ou flavine adénine dinucléotide (FAD)) et leur localisation cellulaire (Ferri *et al.*, 2011). Lorsque j'ai débuté ma thèse, seules des GDHs dépendantes du cofacteur PQQ avaient été démontrées comme impliquées dans le processus d'altération des minéraux par les bactéries, suggérant un rôle central de ces enzymes et de ce type de cofacteur (Liu *et al.*, 1992; Babu-Khan *et al.*, 1995; Goldstein *et al.*, 2003; J. Wagh *et al.*, 2014). Les GDH-PQQ ainsi que les gènes de synthèse de PQQ sont d'ailleurs utilisés comme marqueur de la solubilisation du phosphate dans des études de métagénomique monogénique (Tsurumaru *et al.*, 2015). Parmi les GDH-PQQ dépendantes,

on distingue les enzymes GDH-PQQ-A (les plus répandues) des enzymes hydrosolubles GDH-PQQ-B (identifiées uniquement chez *Acinetobacter calcoaceticus*) (Ferri *et al.*, 2011). Les GDH-PQQ-A sont membranaires et permettent le relargage de gluconate (GA) et protons dans le périplasme. Les GDH-PQQ-B sont localisées dans le cytoplasme, ce qui pose la question de leur rôle dans l'acidification du milieu extérieur et donc son implication dans l'altération des minéraux.

4.1.4. Le cofacteur PQQ

L'implication du cofacteur PQQ dans l'altération a été démontrée par expression hétérologue de gènes de synthèse de PQQ dans des bactéries non-altérantes. Par exemple, *Escherichia coli* est incapable de solubiliser le phosphate inorganique à partir de TCP. Elle est pourtant capable de produire une apo-GDH mais ne possède pas tous les gènes de synthèse de PQQ. Le clonage du gène de synthèse de PQQ (*pqqIII*) de *Erwinia herbicola* a permis d'obtenir la capacité à solubiliser le phosphate par *E coli* (Liu *et al.*, 1992). De même, le clonage du cluster de gènes de synthèse de PQQ de *Acinetobacter calcoaceticus* ou de *Pseudomonas fluorescens* dans une souche d'*Herbaspirillum seropedicae* a conféré à cette dernière la capacité à solubiliser le phosphate (J. Wagh *et al.*, 2014).

D'autre part, la création de mutants a permis de montrer que les gènes de synthèse de PQQ étaient indispensables au phénotype d'altération des minéraux pour certaines souches. Notamment, la mutation des gènes *pqqA* et *pqqB* de *Enterobacter intermedium* entraîne une incapacité des mutants (simples) à solubiliser le phosphate (Han *et al.*, 2008). De même, la création d'une banque de mutants aléatoires chez *Gluconacetobacter diazotrophicus* a permis d'identifier des mutants incapables d'altérer les minéraux (solubilisation du phosphate), dont quatre mutés au niveau des gènes *pqqB*, *pqqC* et *pqqE* (Intorne *et al.*, 2009).

L'analyse de génomes a révélé que l'organisation et le nombre de gènes de synthèse de PQQ étaient variables (de *pqqA* à *pqqG*) (Miller *et al.*, 2010). Notamment, cinq gènes semblent être indispensables à la synthèse du cofacteur PQQ : *pqqA*, *pqqB*, *pqqC*, *pqqD* et *pqqE* (Shen *et al.*, 2012). Les enzymes capables d'utiliser ce cofacteur sont nommées quinoprotéines, mais toutes ne sont pas liées à la capacité à altérer. On pourra noter parmi ces quinoprotéines, les choline-, méthanol-, glucose- et les glycérol- déshydrogénases (Duine, 1991). Les quinoprotéines sont

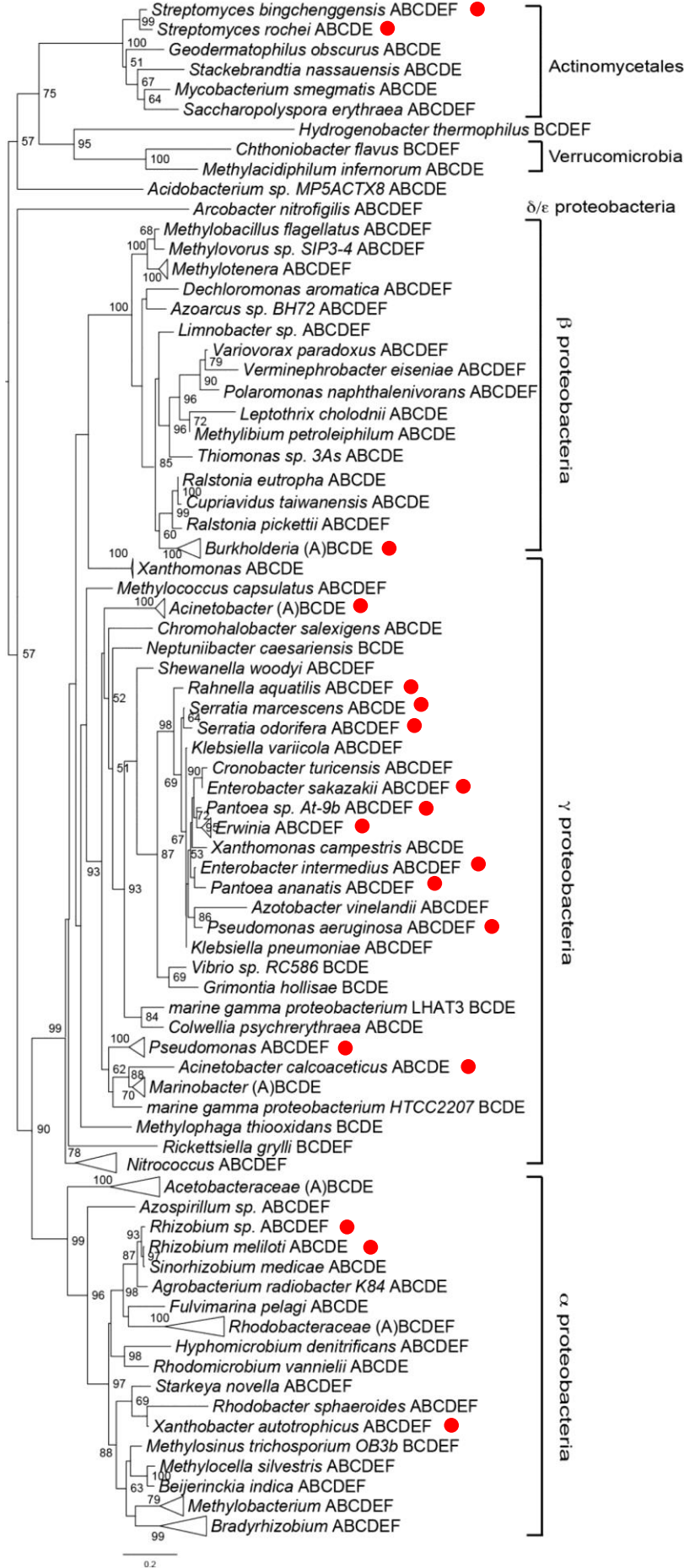


Figure 0.20 : Arbre phylogénétique des espèces bactériennes possédant au moins un gène de synthèse de pqq (Shen *et al.*, 2012)

Les points rouges indiquent que des souches appartenant à ce genre bactérien ont déjà été identifiées comme étant capable d'altérer les minéraux.

majoritairement retrouvées chez les bactéries Gram négatives, mais aussi chez quelques bactéries Gram positives (Shen *et al.*, 2012).

En comparant les genres bactériens possédant un système PQQ et les genres bactériens altérants (Figure 0.20), on observe que les bactéries possédant un système PQQ ou des quinoprotéines ne sont pas toutes altérantes, cela suggère que les gènes de synthèse de PQQ ne sont pas de bons marqueurs du phénotype d'altération. En conséquence, on peut se poser la question de l'existence d'autres mécanismes moléculaires PQQ-indépendants impliqués dans l'altération des minéraux.

4.2. L'acido-complexolyse et la complexolyse

La complexolyse est considérée comme le second mécanisme utilisé par les bactéries pour altérer les minéraux. De nombreux agents complexants (acides organiques, sidérophores, exopolysaccharides...) sont responsables de l'altération des minéraux. Néanmoins, si la production de molécules chélatantes est avérée chez les bactéries, leur rôle dans un contexte cellulaire sur l'altération des minéraux est moins évident. En effet, une grande partie des données accumulées est basée sur des expérimentations en condition abiotique ou le composé chimique pur a été directement testé. Au contraire, les interactions entre minéraux et bactéries productrices d'agents chélatants ont rarement été testées. Les agents complexants peuvent agir de différentes manières sur les minéraux : (i) Soit par action directe au contact du minéral ; l'agent forme un complexe avec un élément chimique à la surface du minéral menant à la libération de cet élément et à la dissolution du minéral. (ii) Soit par action indirecte où l'agent chélate les ions en solution ce qui modifie l'équilibre chimique de la solution et favorise la dissolution en modifiant l'indice de saturation (équation de dissolution ; §2.2.4). Ce changement d'équilibre de la solution peut conduire à une dissolution passive du minéral (Holmén and Casey, 1996; Kraemer, 2004; Parrello *et al.*, 2016; Perez *et al.*, 2019). Parmi les agents complexants sécrétés par les bactéries les principaux pour lesquels une démonstration expérimentale de leur rôle dans l'altération a été faite sont les acides organiques et les sidérophores.

4.2.1. Les acides organiques

Le type d'acide organique produit par les bactéries dépend de la source de carbone (C) utilisée et du type de bactéries. Ainsi les bactéries sont capables de produire différents acides organiques tels que le gluconate, le 2-keto-gluconate (2KGA), l'acétate l'oxalate, le citrate, le tartrate, le succinate, le lactate ou le pyruvate (Robert and Berthelin, 1986; Goldstein, 1995) . En présence de glucose, source de C conférant la meilleure efficacité à altérer, la plupart des bactéries produisent principalement du gluconate, du 2-keto-gluconate (2KGA) et parfois d'autres dérivés.

L'action d'acides organiques sur la dissolution des minéraux a largement été évaluée en condition abiotique en utilisant directement des composés chimiques purs (Welch and Ullman, 1993; Zhang and Bloom, 1999; Reichard *et al.*, 2007; Oburger *et al.*, 2011). Ainsi, certains acides organiques altèrent les minéraux plutôt *via* une action acidifiante (lactate, malate, succinate...), et d'autres au contraire *via* une action complexante (oxalate, tartrate...) (§2.2.3). Leur mode d'action peut différer en fonction des conditions environnementales et surtout du pH de la solution (Moghimi and Tate, 1978). Ces propriétés et le fait que les bactéries produisent une multitude de métabolites peuvent rendre difficile la mise en évidence du rôle des acides organiques et de distinguer l'acidolyse de la complexolyse. Dans un contexte biotique, la construction de mutants est nécessaire pour déterminer la réelle implication des acides organiques dans l'altération des minéraux. A ce jour, l'action de deux acides organiques a été démontrée de cette manière : le citrate (Buch *et al.*, 2009; Adhikary *et al.*, 2014; Jitendra Wagh *et al.*, 2014; Yadav *et al.*, 2014) et l'acétate (Wang *et al.*, 2018).

4.2.1.1. Le citrate

L'implication du citrate dans l'altération a été démontrée par la surexpression de deux gènes (*gltAI* et *citC*) dans des bactéries initialement non efficaces leur conférant ou augmentant leur capacité à altérer les minéraux comme démontré *via* les tests réalisés sur TCP. Le gène *gltAI* code pour la citrate synthase de *E coli*. Le gène *citC* code pour un transporteur de citrate de *S. typhimurium*. La surexpression du gène *gltAI* dans *Herbaspirillum seropedicae* Z67 lui confère le phénotype de solubilisation du phosphate (Jitendra Wagh *et al.*, 2014). Lorsque les deux gènes *gltAI* et *citC* sont surexprimés, l'exportation du citrate augmente et donc la solubilisation du phosphate est plus importante. Les mêmes résultats ont été obtenus pour des souches de

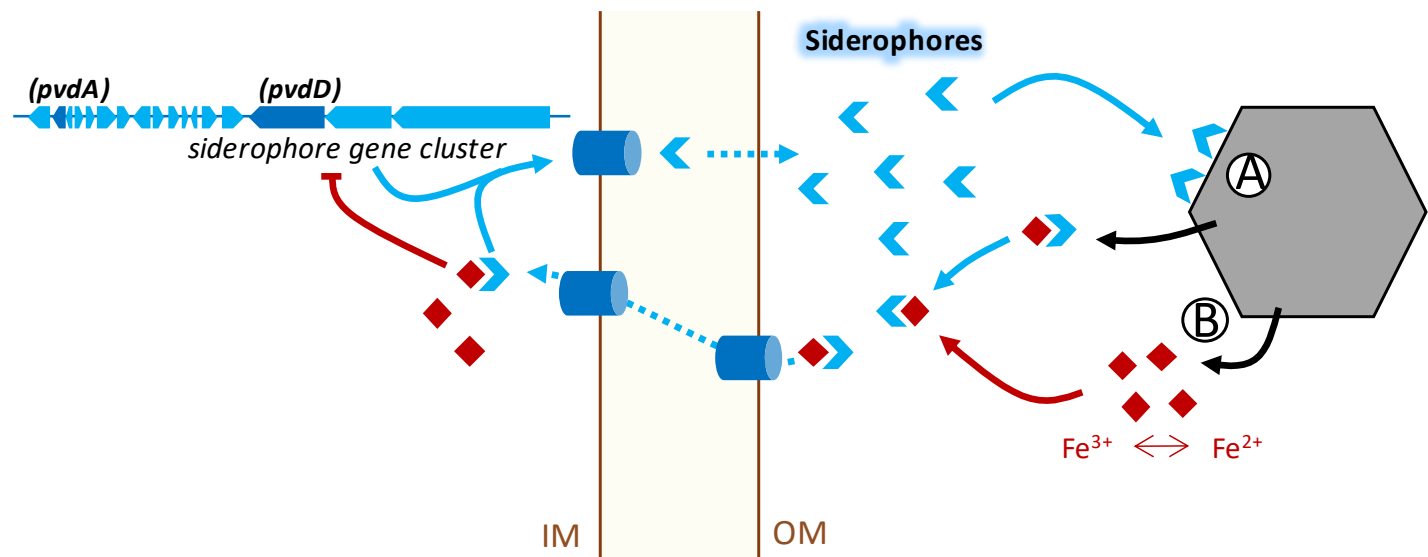


Figure 0.21 : Les sidérophores

Les sidérophores sont produits par les bactéries dans le milieu extérieur en fonction de la concentration en fer. Ils peuvent agir de deux façon sur la dissolution des minéraux. **(A)** Ils peuvent agir en contact direct sur la surface des minéraux en chélatant les éléments chimiques de surface. **(B)** les minéraux relarguent de manière passive des éléments chimiques dans le milieu en fonction de l'équilibre chimique de la solution. Les sidérophores se lient aux éléments chimiques de la solution, cela modifie l'équilibre de la solution qui favorise la dissolution passive du minéral. Le complexe élément chimique-sidérophore est reconnu par les récepteurs membranaires des bactéries qui assimilent le complexe. L'élément chimique est utilisé dans les processus cellulaires tandis que le sidérophore peut être recyclé et réexporté dans le milieu extracellulaire. Si l'élément chimique est du fer, il peut induire une inhibition de la synthèse de sidérophore lorsque sa concentration dépasse un certain seuil.

Pseudomonas (Adhikary *et al.*, 2014) ou *Enterobacter* (Yadav *et al.*, 2014). Pour *Pseudomonas fluorescens*, la surexpression du gène *gltA1* permet d'augmenter de 2 fois la solubilisation du phosphate par rapport à la souche sauvage en condition tamponnée suggérant une action complexante du citrate (Buch *et al.*, 2009).

4.2.1.2. Acétate

Une démonstration génétique de l'implication de l'acétate dans l'altération des minéraux a été réalisée sur *Enterobacter cloacae* S71 (Wang *et al.*, 2018). Trois mutants impactés dans l'altération de la biotite ont été obtenus. Dans ce cas, le rôle de l'acidification a pu être exclu car les mutants présentaient les mêmes valeurs de pH en fin d'expérience par rapport à la souche sauvage. Les gènes mutés sont impliqués dans les deux voies de synthèse de l'acétate : (i) le gène *pta* codant pour une phosphotransacétylase et le gène *ackA* codant une acétate kinase, ces deux protéines sont responsables de la conversion de l'acétyl-CoA en acétate et adénosine triphosphate, (ii) le gène *poxB* code pour une pyruvate oxidase qui transforme le pyruvate en acétate et produit une molécule de CO₂ (De Mey *et al.*, 2007).

4.2.2. Les sidérophores

Du fait de leur affinité particulière pour le fer mais également les ions di- ou trivalents, les sidérophores ont été considérés comme des acteurs importants de l'altération. On distingue principalement la famille des catécholates et des hydroxamates. Ils peuvent être synthétisés par la voie dépendante des non-ribosomal peptide synthetase (NRPS) ou la voie NRPS-indépendante (NIS) (Challis, 2005; Kadi and Challis, 2009). Historiquement, le rôle des sidérophores dans l'altération des minéraux a été démontré en conditions abiotiques en utilisant la desferrioxamine-B (DFO-B), ou la desferrioxamine mesylate (DFAM), sidérophore produit par *Streptomyces* (Liermann *et al.*, 2000). Ces démonstrations ont eu lieu avec différents minéraux plus ou moins facilement altérables tels que des oxy-hydroxydes de fer (hématite, goethite), du basalte, de la hornblende et des verres synthétiques (Figure 0.21) (Hersman *et al.*, 1995; Reichard *et al.*, 2007; Perez *et al.*, 2015).

Cependant, tout comme les acides organiques, il est difficile en condition biotique de mettre en évidence le rôle des sidérophores. Pour pouvoir différencier l'effet du sidérophore de l'effet d'une acidification par une souche bactérienne, il est important d'étudier l'activité chélatante du

sidérophore sur le minéral dans des conditions de pH contrôlé ou de comparer une souche sauvage avec son mutant incapable de produire un sidérophore. Finalement, en prenant en compte ces critères, très peu d'études ont identifié des gènes de synthèse/transport/utilisation de sidérophores impliqués dans l'altération des minéraux.

On peut citer les travaux réalisés avec la souche de *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. Différentes études ont comparé des mutants simples incapables de produire de la pyoverdine ($\Delta pvdD$ et $\Delta pvdA$) (Ochsner *et al.*, 2002) ou de la pyochéline ($\Delta pchE$ et $\Delta pchF$) (Reimann *et al.*, 1998), ainsi que le double mutant incapable de produire les deux sidérophores (Ferret *et al.*, 2014). Ces travaux ont révélé que le mutant simple incapable de produire la pyochéline n'était pas affecté dans sa capacité à altérer alors que le mutant simple de la pyoverdine était fortement impacté. Un double mutant s'est avéré aussi fortement altéré dans sa capacité à solubiliser la smectite par rapport à la souche sauvage (Ferret *et al.*, 2014). L'ensemble de ces résultats démontre que la pyoverdine est plus efficace pour dissoudre la smectite que la pyochéline, probablement en raison de sa plus forte affinité pour le fer (Ferret *et al.*, 2014). La diminution de la capacité d'altération d'un mutant pyoverdine a également été observée sur la nontronite (Parrello *et al.*, 2016). On peut donc considérer que les gènes de synthèse de pyoverdine sont impliqués dans l'altération des minéraux.

Certaines études supportent que les sidérophores et les acides organiques agissent de manière synergique dans le processus de dissolution des minéraux (Reichard et al., 2007; Dehner et al., 2010; Ahmed and Holmström, 2014; Parrello et al., 2016; Lin et al., 2018; David et al., 2020).

4.2.3. Les substances polymériques extracellulaires et les flagelles

Jusqu'à présent dans cette introduction, les mécanismes moléculaires décrits ne nécessitent pas un contact direct entre cellule bactérienne et minéral. Cependant, les bactéries peuvent interagir de manière permanente ou transitoire avec la surface des minéraux en formant des biofilms par exemple (Jones and Bennett, 2017). La question se pose dès lors de l'impact de cette interaction sur le minéral. La formation de biofilms bactériens peut protéger la surface des minéraux et inhiber leur altération (Lüttge and Conrad, 2004) ou au contraire elle peut augmenter leur altération (Li and Sand, 2017).

Les substances polymériques extracellulaires¹⁸ (EPS) et les flagelles jouent un rôle dans l'attachement des cellules sur des surfaces solides (comme les minéraux) et donc la formation de biofilms (Gehrke *et al.*, 1998; O'Toole and Kolter, 1998; Cao *et al.*, 2011). La formation de biofilms est dépendante du type de minéral et de sa surface (porosité, charges), des conditions environnementales et des bactéries impliquées. On peut donc envisager *a minima* un rôle indirect des EPS dans l'altération des minéraux par les bactéries.

A l'heure actuelle, une seule étude a démontré le rôle du flagelle dans l'altération des minéraux au niveau génétique. La souche de *Rhizobium pusense* S41 a été mutée au niveau du gène de synthèse de flagelle *fliF* impactant sa capacité d'altération de la biotite par rapport à la souche sauvage (Wang *et al.*, 2019). Un effet pléiotropique¹⁹ n'est cependant pas à exclure.

4.3. L'oxydo-réduction

L'oxydation (perte d'un électron) ou la réduction (gain d'un électron) d'éléments chimiques contenus dans les minéraux peut favoriser leur dissolution. Ce processus d'altération nécessite un contact direct entre les cellules et le minéral. L'implication des mécanismes d'oxydoréduction dans l'altération des minéraux par les bactéries diffère en fonction des conditions du milieu et surtout de la concentration en oxygène. En condition oxique, les bactéries produisent des molécules oxydo-réductrices qui peuvent jouer un rôle dans l'altération des minéraux. En condition anoxique, les bactéries vont utiliser les minéraux comme accepteurs d'électrons pour leur respiration menant à leur altération.

4.3.1. En condition oxique

Parmi les molécules oxydoréductrices produites par des bactéries et impliquées dans l'altération des minéraux, seules les phénazines ont été décrites. Les phénazines sont des composés hétérocycliques azotés produits par une large gamme de bactéries (Pierson and Pierson, 2010). Elles ont d'abord été très étudiées pour leur propriétés d'antibiotiques à large spectre et plus récemment pour leur capacité oxydoréductrices (Laursen and Nielsen, 2004; Pierson and Pierson, 2010).

¹⁸ Les EPS sont définies comme étant des polymères d'origine microbienne responsables du lien des cellules entre elles ou avec une surface solide. Elles sont composées majoritairement de polysaccharides et peuvent contenir aussi des protéines, des acides nucléiques et des lipides (Wingender *et al.*, 1999).

¹⁹ Capacité d'un gène à déterminer plusieurs fonctions.

La souche de *Pseudomonas chlororaphis* PCL1391 produit deux types de phénazines : la phénazine-1-carboxamide (PCN) et la phénazine acide carboxilique (PCA). Le gène *phzB* fait partie d'un opéron impliqué dans la synthèse de phénazines (Mavrodi *et al.*, 1998). Le mutant *phzB*, incapable de produire des phénazines, est impacté dans sa capacité à dissoudre les oxydes de fer comparativement à la souche sauvage (Hernandez *et al.*, 2004). Une deuxième étude a montré l'implication des phénazines dans l'altération des minéraux grâce à la mutation du gène *phzH* de *Pseudomonas aeruginosa*. En effet, le mutant $\Delta phzH$ est impacté dans la bio-corrosion du fer comparativement à la souche sauvage (Huang *et al.*, 2018). D'après cette étude, la protéine PhzH serait responsable du contrôle du transfert d'électrons de l'extérieur à l'intérieur des cellules pendant la bio-corrosion (Huang *et al.*, 2018).

Des expériences *in vivo* ont également pu montrer l'implication des phénazines dans l'altération des minéraux. L'inoculation de la souche de *Pseudomonas synxantha* 2-79 dans la rhizosphère du blé augmente la disponibilité du fer à partir d'oxy-hydroxydes et de silicates comparativement au mutant incapable de produire des phénazines suggérant que les phénazines améliorent la réactivité et la mobilité du fer provenant des minéraux du sol (LeTourneau *et al.*, 2019).

En plus d'être impliqués dans l'altération des minéraux, les phénazines jouent un rôle dans la formation de biofilms (LeTourneau *et al.*, 2018) ce qui pourrait être un deuxième aspect favorisant l'altération des minéraux en plus de leur propriétés oxydoréductrices.

4.3.2. En condition anoxique

En condition anaérobie (sol hydromorphe...), certaines bactéries peuvent utiliser le fer, manganèse, soufre ou cuivre comme accepteurs ou donneurs d'électrons pour leur respiration (Newman, 2001; Weber *et al.*, 2006), on parle respectivement de bactéries réductrices ou oxydatrices. La majorité des études se sont concentrées sur des minéraux facilement altérables (oxy-hydroxydes) mais récemment, l'implication des bactéries oxydatrices du fer dans l'altération de minéraux plus complexes (roche mère granitique provenant de la zone critique de Porto Rico) a été démontrée (Napieralski *et al.*, 2019). Dans ce cas, l'altération observée est due à l'utilisation du fer, manganèse, soufre ou cuivre contenus dans ces minéraux. Les échanges d'électrons entre les cellules et la surface des minéraux entraînent une réduction ou une oxydation de ces éléments chimiques. Le changement d'état rédox conduit à la rupture de

certaines interactions établies au sein de la structure du minéral et peut mener à une dissolution localisée.

Les mécanismes moléculaires mis en jeu diffèrent en fonction des bactéries étudiées. En ce qui concerne les bactéries oxydatrices, des analyses génomiques et protéomiques ont mis en évidence l'implication des cytochromes dans les mécanismes d'oxydation du fer. Par exemple, le cytochrome de type c (Cyc2) de *Acidithiobacillus ferrooxidans* (localisé au niveau de la membrane externe) catalyse l'oxydation du Fe(II) en Fe(III). Les électrons sont pris en charge au niveau de la membrane plasmique par une cytochrome oxydase aa3 (Valdés *et al.*, 2008).

En ce qui concerne les bactéries réductrices, l'étude de Zacharoff *et al.* a montré l'implication d'un cytochrome membranaire PgcA dans la réduction d'oxyde de fer (III) et d'oxyde de manganèse (IV) pour la souche de *Geobacter sulfurreducens* grâce à la création d'un mutant Δ pgcA (Zacharoff *et al.*, 2017). En plus des cytochromes, les transferts d'électrons pourraient être permis grâce à des quinones et quinols²⁰ identifiés chez *Shewanella lithotrophicus* et *Shewanella oneidensis* (Shi *et al.*, 2016).

Les mécanismes d'oxydoréduction nécessitent un contact direct entre cellules et minéral, notamment la présence de pili et nanofils identifiés chez *Geobacter spp.* pourrait permettre cette interaction (Weber *et al.*, 2006; Shi *et al.*, 2016).

4.4. D'autres mécanismes moléculaires impliqués ?

Les mécanismes (*i.e.*, acidolyse, complexolyse, oxydo-réduction) listés ci-dessus sont ceux considérés comme les plus importants dans l'altération des minéraux. Néanmoins, quelques études ont pu mettre en évidence des gènes impliqués dans l'altération des minéraux soit dans des conditions très particulières (l'anhydrase carbonique), soit des gènes dont la mutation limite la croissance bactérienne lors des tests d'altération des minéraux.

4.4.1. L'anhydrase carbonique

En fonction des conditions du milieu (faibles concentrations en CO₂ et calcium, pH du milieu) il a été suggéré que certaines bactéries pourraient utiliser une enzyme, l'anhydrase carbonique (CA) pour dissoudre les minéraux. Cette enzyme catalyse la réaction d'hydratation du dioxyde

²⁰ Les quinones et leur forme réduite quinols sont des composés aromatiques capables de transférer les électrons au niveau de la membrane cytoplasmique (Shi *et al.*, 2016).

de carbone pour former un proton et du bicarbonate : $\text{CO}_2 + \text{H}_2\text{O} = \text{H}^+ + \text{HCO}_3^-$. Dans certaines conditions, les protons produits pourraient altérer les minéraux par acidolyse quand ils ne sont pas neutralisés par les carbonates formés (Favre *et al.*, 2009). L'implication de l'anhydrase carbonique de *Bacillus mucilaginosus* dans la dissolution de wollastonite a été démontrée en condition contrôlée et en utilisant la protéine purifiée directement (Xiao *et al.*, 2014, 2015). Cependant, aucune des expériences de mutagenèse aléatoire réalisée sur un large éventail de bactéries altérantes n'a permis d'obtenir de mutants de la CA impactés dans l'altération des minéraux. Ceci est peut-être dû au nombre important de copies dans les génomes des bactéries étudiées ou aux conditions particulières nécessaires à la mise en évidence de l'action de cette enzyme.

4.4.2. Des mécanismes indirects

4.4.2.1. L'énolase

La création d'une banque de mutants aléatoires de *Burkholderia cenocepacia* 71-2 a permis d'identifier un mutant impacté dans sa capacité à altérer les minéraux (Liu *et al.*, 2019). Le gène *eno* muté code pour une enolase. Cette enzyme impliquée dans la glycolyse catalyse la déshydratation du 2-phosphoglycerate en phosphoenolpyruvate. Cette étape étant importante pour le métabolisme bactérien, les auteurs suggèrent que la mutation du gène *eno* entrainerait un retard de croissance expliquant les différences observées dans la capacité à altérer vis-à-vis de la souche sauvage.

4.4.2.2. La formation de ponts disulfures (DsbA)

Une expérience de mutagenèse aléatoire sur la souche de *Pseudomonas fluorescens* F113 a permis d'identifier différents mutants impactés dans la capacité à altérer les minéraux (solubilisation du phosphate inorganique) (Miller *et al.*, 2010). Un des mutants présente une mutation au niveau du gène *dsbA* qui code pour une enzyme impliquée dans la biogénèse de protéines exportées en formant des ponts disulfures (Mavrodi *et al.*, 2006). Les auteurs suggèrent que le phénotype observé pour ce mutant serait plutôt lié à la perte d'activité des enzymes non maturées par DsbA (Miller *et al.*, 2010).

4.5. La régulation des mécanismes moléculaires de l'altération

Nous avons pu voir les différentes molécules impliquées ou potentiellement impliquées dans l'altération des minéraux par les bactéries. Ces molécules sont-elles régulées en fonction de la disponibilité en éléments nutritifs ou en fonction de la présence/absence du minéral ?

4.5.1. Effet de la carence en phosphate

La fonction d'altération des minéraux semble être régulée en fonction de l'état de carence en phosphate des bactéries.

Des études ont montré que la carence en phosphate avait une influence sur l'expression des gènes de synthèse de PQQ et de GDH. En effet, en carence de phosphate, les gènes de synthèse de GDH et de PQQ sont surexprimés dans la souche de *Pseudomonas putida* KT2440 (An and Moe, 2016). De plus, *Serratia sp.* S119 qui possède un opéron de 6 gènes de synthèse de PQQ, présente une surexpression du gène *pqqE* ainsi qu'une augmentation de l'activité de deux promoteurs de l'opéron en carence de phosphate (Ludueña *et al.*, 2017).

Ensuite, des études sur l'activité de la GDH-PQQ ont montré des variations en fonction de la disponibilité en phosphate. Par exemple, la GDH-PQQ est exprimée de manière constitutive chez *Enterobacter asburiae*, mais son activité est 5 fois plus importante en condition de carence de phosphate (Gyaneshwar *et al.*, 1999). De plus, l'activité de la GDH-PQQ de *Burkholderia* est détectée uniquement en carence en phosphate peu importe la source de carbone utilisée (glucose ou glycérol) (Bernabeu *et al.*, 2016).

Les analyses de transcriptomique ont permis également d'identifier la régulation des gènes en fonction de la concentration en phosphate disponible. Pour la souche de *Burkholderia multivorans* WS-FJ9, des gènes de détection du phosphate, de transport (ABC transporteurs, porines) et de régulation transcriptionnelle (système *phoR*) sont surexprimés en carence. A l'inverse les gènes surexprimés en présence de phosphate sont liés à la synthèse de flagelle, au métabolisme du mannose et des processus de signalisation (Zeng *et al.*, 2017).

Il semblerait que la carence en phosphate peut avoir un rôle dans la régulation des gènes de l'altération mais cela reste dépendant de la souche testée. D'autres facteurs régulant cette fonction sont probablement impliqués et notamment la présence du minéral en lui-même.

4.5.2. Effet de la présence du minéral

Pour déterminer l'effet de la présence du minéral sur la sécrétion de protéines d'une bactérie altérante, Xiao *et al.* ont mis *Bacillus mucilaginosus* en culture dans un milieu carencé en potassium (K) en présence ou absence d'un minéral contenant du potassium dans sa structure (Xiao *et al.*, 2012). Les protéines différentiellement sécrétées par *Bacillus mucilaginosus* en présence ou absence du minéral ont été ensuite analysées. Seulement 24 protéines ont été retenues, 12 surexprimées et 12 sous-exprimées. Cela démontre que la présence du minéral influence le protéome de la souche testée. Cependant, les protéines identifiées n'ont pas de rôle direct déjà décrit dans l'altération des minéraux (glycine hydroxyméthyltransférase ; phosphosérine aminotransférase ; cétoI-acide réductoisomérase ; ABC transporteurs).

En ce qui concerne les études basées sur des analyses de protéomiques et transcriptomiques, on peut citer Olsson-Francis *et al.* et Bryce *et al.* qui ont étudiés la souche *Cupriavidus metallidurans* CH34 en présence/absence de basalte (Olsson-Francis *et al.*, 2010; Bryce *et al.*, 2016).

Olsson-Francis *et al.* ont étudiés la régulation de l'expression des gènes de la souche CH34 en conditions de carences en fer avec (-Fe+B) ou sans minéral (-Fe-B) ou non-carencées (+Fe-B). La différence majeure observée entre la condition carencée (-Fe-B) et les autres est la production de sidérophores uniquement en condition carencée (-Fe-B) (observée phénotypiquement et par surexpression des gènes de synthèse). L'absence d'expression des gènes liés à la synthèse de sidérophores en présence d'un minéral suggère que la dissolution passive du minéral relargue une quantité suffisante de fer pour inhiber la production de sidérophores. Des différences importantes ont été observées entre les conditions de présence et absence du minéral. Les gènes régulés négativement en présence du minéral sont des régulateurs transcriptionnels et des cytochromes de type c. A l'inverse les gènes surexprimés en présence de minéral sont des transporteurs (transporteurs ABC, perméases), des gènes liés à la motilité (chimiotactisme, flagelles) et à la résistance aux métaux lourds (systèmes d'efflux, systèmes de détoxification) (Olsson-Francis *et al.*, 2010).

Cette étude a été complétée par une analyse protéomique sur la même souche, cette fois-ci en carence de fer ou magnésium et en présence ou absence de basalte (Bryce *et al.*, 2016). Les mêmes résultats ont été obtenus en présence de basalte quel que soit la carence suggérant que le minéral est le facteur majeur de la régulation des protéines dans ces conditions

comparativement à la disponibilité en nutriments. Globalement, ces résultats indiquent que la présence de basalte entraîne une réponse apparentée à un stress de la bactérie étudiée.

A l'heure actuelle, il y a peu de gènes dont l'implication dans l'altération des minéraux a été démontrée. La disponibilité en nutriments ainsi que la présence/absence du minéral semblent entraîner une expression différentielle de certains gènes dont certains pourraient être impliqués dans l'altération des minéraux par les bactéries. Néanmoins, les premiers résultats ont été obtenus sur quelques souches bactériennes et seulement deux types de minéraux. Enfin, les régulations pourraient être beaucoup plus complexes prenant en compte le type de minéral, les conditions du milieu, la source de carbone disponible et la disponibilité en nutriments.

5. Questions et objectifs de la thèse

Dans cette introduction (§4), différents mécanismes moléculaires démontrés ou suspectés de jouer un rôle direct ou indirect dans la capacité de certaines bactéries à altérer les minéraux ont été présentés. Cependant la réelle implication de ces mécanismes dans l'altération des minéraux a rarement été démontrée expérimentalement. C'est pourquoi l'objectif global de ma thèse est de répondre à cette question (divisée par la suite en sous-questions) :

Quels sont les gènes et les mécanismes moléculaires impliqués dans l'altération des minéraux par les bactéries du sol ?

Pour répondre à cet objectif global, j'ai concentré mes travaux de thèse sur l'étude de la souche modèle *Collimonas pratensis* PMB3(1) (présentée plus en détails dans le CHAPITRE 1).

Comme présenté précédemment, l'acidolyse semble être le mécanisme principal de l'altération des minéraux par les bactéries. Cette acidolyse est basée sur la production de protons par les bactéries. D'après la littérature les mécanismes moléculaires impliqués seraient liés à la voie d'oxydation directe du glucose (OD) *via* une glucose déshydrogénase PQQ-dépendante. Le gène codant pour l'enzyme GDH-PQQ et les gènes de synthèse de son cofacteur PQQ seraient

donc les principaux gènes de l'altération des minéraux. Cependant, toutes les bactéries altérantes ne possèdent pas les gènes de synthèse de PQQ ni de GDH-PQQ.

Q1 : La souche modèle PMB3(1) possède-t-elle une GDH-PQQ et les gènes de synthèse de PQQ ? Dans le cas contraire quels sont les gènes impliqués dans l'altération des minéraux par acidolyse ?

D'autres mécanismes moléculaires de l'altération ont été décrits et notamment la complexolyse. L'altération des minéraux par complexolyse pourrait être liée aux sidérophores. En effet, quelques études ont pu montrer l'implication de la pyoverdine dans l'altération des minéraux en condition biotique. Néanmoins, tous les sidérophores ne sont pas capables d'altérer les minéraux. D'après les études réalisées dans le laboratoire, la souche PMB3(1) est capable de chélater le fer sur le milieu CAS suggérant sa capacité à produire un sidérophore (Uroz *et al.*, 2009b).

Q2 : Quel type de sidérophore est produit par la souche modèle PMB3(1) et est-il impliqué dans l'altération des minéraux par complexolyse ?

Q2.1 : Les sidérophores altèrent-ils de la même manière tous les types de minéraux ?

Dans les sols forestiers, les bactéries peuvent être confrontées à différents types d'environnements présentant différentes sources de carbone, une disponibilité en nutriments variable, ou un pouvoir tampon plus ou moins fort. Un milieu fortement tamponné peut neutraliser les protons produits par les bactéries altérantes inhibant alors les mécanismes d'acidolyse ce qui pourrait favoriser les mécanismes de complexolyse. Par exemple, la solution de sol est considérée comme une solution faiblement tamponnée, mais dans des conditions particulières (sols calcaires par exemple), des anions (tel que HCO_3^-) peuvent être présents et tamponnent le milieu. Certains habitats préférentiellement colonisés par les bactéries tels que la rhizosphère ou la mycorrhizosphère se singularisent du sol environnant par la présence de différentes sources de carbone (*i.e.*, glucose, fructose, saccharose, tréhalose, mannitol...). Comme expliqué dans l'introduction, ces différents sucres engagent des voies métaboliques différentes menant à une acidification plus (glucose) ou moins (mannitol) importante.

Q3 : Les facteurs intrinsèques (*i.e.*, propriétés du minéral) et extrinsèques (*i.e.*, propriétés liées à l'environnement) influencent-ils les mécanismes moléculaires mis en jeu par les bactéries pour altérer les minéraux ?

Q3.1 : Quel est l'effet du pouvoir tampon du milieu sur l'efficacité à altérer les minéraux et les mécanismes impliqués pour la souche PMB3(1) ?

Q3.2 : Quel est l'effet de la source de carbone sur l'efficacité à altérer les minéraux et les mécanismes impliqués pour la souche PMB3(1) ?

Q3.3 : Le rôle et l'efficacité des mécanismes moléculaires impliqués dans l'altération différent-ils en fonction du type de minéral ?

Nous avons vu (§4.5) que les mécanismes moléculaires de l'altération semblent être régulés en fonction de la carence en nutriments et de la présence physique d'un minéral, mais les démonstrations sont rares et partielles. Il a ainsi été démontré que pour certaines souches bactériennes, la carence en phosphate entraîne une surexpression de la GDH-PQQ et des gènes de synthèses de PQQ. La présence d'un minéral peut aussi s'apparenter à un stress. A titre d'exemple, la présence de basalte semble entraîner l'expression de mécanismes liés à la résistance aux métaux lourds de la souche *Cupriavidus metallidurans* (Olsson-Francis *et al.*, 2010; Bryce *et al.*, 2016). La régulation des gènes en fonction de la présence ou absence d'un minéral et de la carence en éléments nutritifs n'a été testée que sur une seule souche (*Cupriavidus*) et une seule roche (basalte). L'expression et la régulation des gènes face à d'autres types de minéraux plus récalcitrants et ayant un contenu chimique différent restent à découvrir, ainsi que la conservation ou les variations de ces mécanismes/gènes qui pourraient singulariser d'autres souches bactériennes.

Q4 : Quel est l'effet de la disponibilité en nutriments inorganiques et de la présence/absence d'un minéral sur l'expression et la régulation des gènes de la souche PMB3(1) ?

Pour répondre à ces différentes questions, ma thèse est organisée de la manière suivante :

Dans le CHAPITRE 1 est présenté la souche modèle choisie et les résultats préliminaires de l'exploitation de son génome. L'analyse du génome a permis de souligner la réelle nécessité de développer deux approches complémentaires avec et sans *a priori* qui constituent les deux chapitres suivants (CHAPITRE 2 et 3).

Le CHAPITRE 2 présente l'approche sans *a priori* (mutagénèse aléatoire) et répond à la question **Q1**. Le CHAPITRE 3 traite de l'approche avec *a priori* (mutagénèse ciblée) et répond à la question **Q2**. Les résultats obtenus m'ont permis d'élucider les principaux mécanismes moléculaires mis en jeu dans l'altération des minéraux pour la souche modèle PMB3(1).

Dans le CHAPITRE 4 est présenté l'effet de facteurs environnementaux et du type de minéral sur les mécanismes moléculaires découverts. Des réponses sont apportées aux questions **Q2.1, Q3, Q3.1, Q3.2 et Q3.3**.

Enfin, le CHAPITRE 5 apporte une vision préliminaire (car en cours d'analyse) mais plus globale (comparativement aux CHAPITRES 2 et 3) des mécanismes moléculaires de l'altération par une approche de transcriptomique et protéomique, il répond également à la question **Q4**.

Les différents chapitres de résultats sont suivis d'une conclusion générale qui propose une réflexion plus poussée sur l'intégralité de mes résultats et des perspectives.

CHAPITRE 1

Écologie des *Collimonas* et focus sur la souche modèle *Collimonas pratensis* PMB3(1)

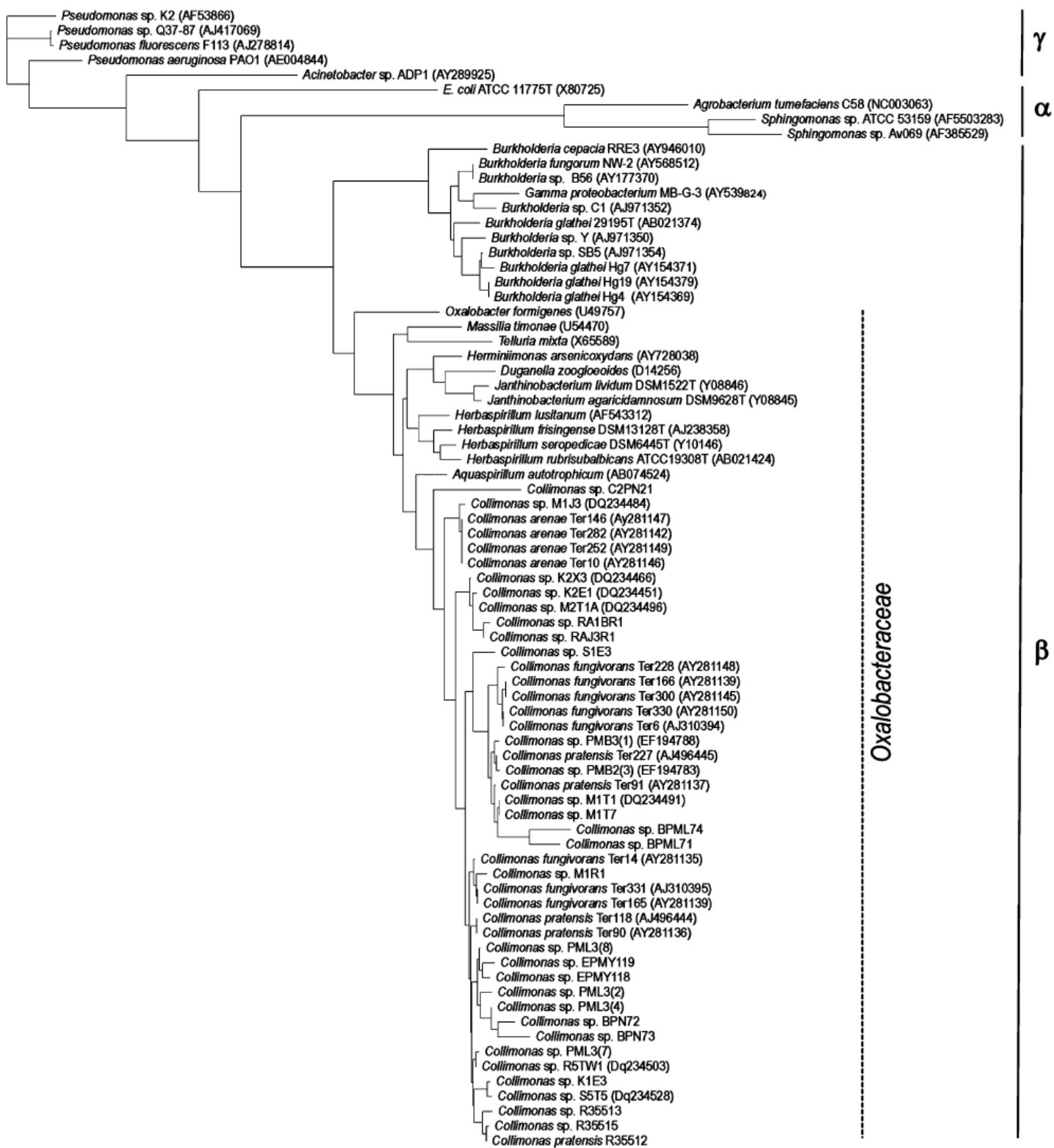


Figure 1.1 : Arbre phylogénétique des *Collimonas* et genres bactériens proches (Leveau *et al.* 2010)

Arbre phylogénétique montrant le placement des souches de *Collimonas* en tant que membres de la famille des Oxalobacteraceae, en fonction des alpha- et gamma-protéobactéries. Cet arbre se base sur l'alignement de séquences partielles d'ARNr 16S amplifiés par l'amorce pA-907R.

1. Le genre bactérien *Collimonas*

1.1. Historique

La première souche de *Collimonas* a été isolée en 1998 dans le sol de la dune côtière de l'Île des Wadden Terschelling (Pays Bas) (De Boer *et al.*, 1998a). Elle a d'abord été assignée au genre bactérien *Pseudomonas* suite à l'analyse de son profil d'acides gras membranaires (De Boer *et al.*, 1998b). Le gène codant l'ARNr 16S de cette souche a été séquencé en 2001 menant à la création d'un nouveau genre bactérien appartenant aux β -protéobactéries appelé *Collimonas* pour les cellules « monas » de la colline « collis » en 2004 (De Boer *et al.*, 2001, 2004).

1.2. La taxonomie

Le genre bactérien *Collimonas* fait partie de l'ordre des *Burkholderiales* et de la famille des *Oxalobacteraceae*. Les plus proches cousins sont les *Massilia*, *Janthinobacterium*, *Herbaspirillum*, *Glaciimonas*, *Herminiimonas*... A ce jour, on peut compter 4 espèces différentes de *Collimonas* : *C. fungivorans* (De Boer *et al.*, 2004), *C. arenae*, *C. pratensis* (Höppener-Ogawa *et al.*, 2008) et *C. antrihumi*²¹ (Lee, 2018) (Figure 1.1).

1.3. Le contexte écologique

1.3.1. Les méthodes de détection : cultivable et non-cultivable

Les *Collimonas* peuvent être isolés par des approches cultivables basées sur l'utilisation de milieux de culture non spécifiques classiquement utilisés pour l'isolement de bactéries du sol (milieux : TSA 1/10 ou TSB 1/10). Des phases d'enrichissement sur milieu sélectif ont aussi été utilisées. Par exemple, on peut citer un milieu de sélection composé de chitine qui permet d'enrichir la population bactérienne en *Collimonas* du fait de leur capacité à l'hydrolyser (De Boer *et al.*, 1998b, 2004). Un autre milieu de culture sélectif à base de TSB supplémenté de 50 mg/l de natacide et 30 mg/l d'acide nalidixique a aussi été utilisé pour préférentiellement obtenir des *Collimonas* (Uroz *et al.*, 2014).

²¹ A ce jour, un seul représentant de l'espèce *C. antrihumi* a été identifié. De plus, la création de cette nouvelle espèce est basée uniquement sur des tests physiologiques et le séquençage du gène *rrs*, aucun génome n'a été généré).

Tableau 1.1 : Liste non-exhaustive de différentes souches de *Collimonas* isolées et leur origine écologique (complété à partir de Leveau *et al.* 2010)

Isolates	Environment	Region, country	Reference
22 Ter isolates	Soil (pH 4.9–6.1) from the upper 10 cm within the tussocks of Marram grass (<i>Ammophila arenaria</i>); low in calcium carbonate, slightly acidic	Inner dune sites on the Wadden island of Terschelling, the Netherlands	de Boer <i>et al.</i> (1998b; 2001; 2004)
2 isolates and 4 uncultured	Mineral soil from mature forest, dominated by lodgepole pine (<i>Pinus contorta</i> Dougl.) and rhizosphere soil of lodgepole pine seedlings	British Columbia Ministry of Forests Long-Term Soil Productivity installation sites, Canada	Axelrood <i>et al.</i> (2002); Chow <i>et al.</i> (2002)
Isolate Hg1	Hillside soil, with pine tree vegetation, 3 m from naphthalene-contaminated seep	South Glens Falls, upstate New York, USA	Wilson <i>et al.</i> (2003)
Isolates A8 and A23	Phytosphere of the moss <i>Aulacomnium palustre</i> , growing in mire behind dunes at Baltic Sea coast	Natural reserve 'Ribnitzer Grosses Moor', near Rostock, Germany	Opelt and Berg (2004)
Isolates F11 and F14	Flow chamber biofilm from 2,4-d-spiked brown forest soil (pH 5.0), with no previous exposure to 2,4-d	Location of forest not specified, but in the UK	Aspray <i>et al.</i> (2005)
G sequences (ab011716-28,37/38,44)	Not specified	Not specified, but probably in Japan	Shikano and Mitsui (unpublished)
Isolate RE1 (dq365897)	Not specified	Jeju, Southern Korea	Yoon <i>et al.</i> (unpublished)
33 isolates	Forest soil, stream water, tundra soil, mire pond sediment	Finnish Lapland	Männistö and Häggblom (2006)
Isolate GCM11	Ikaite tufa columns from a depth of approximately 10 m	Ikka Fjord, South West Greenland	Schmidt <i>et al.</i> (2006)
Drobligo_Isolate34 3 (am710196)	Organically managed farm soil	Droevendaal, the Netherlands	Senechkin <i>et al.</i> (2010)
6 wged isolates (ef408849,50,54,58,59,67)	Unspecified, possibly from ginseng roots	Unspecified (probably China)	Qiu and Song (unpublished)
4 PML and 2 PMB isolates	Mycorrhizosphere and symbiotic mantle of oak (<i>Quercus petraea</i>)- <i>Scleroderma citrinum</i> ectomycorrhizae	Experimental forest site, Breuil, France	Uroz <i>et al.</i> (2007)
26 isolates	Dune grassland (pH 4.7–5.3), unfertilized grassland (pH 4.9–5.8), ex-agricultural land (pH 5.1–5.6), heathland (pH 4.1)	Various locations in the Netherlands	Höppener-Ogawa <i>et al.</i> (2008)
MB1S1_H07 (ef664464)	Forest soil	GASP KBS-LTER sampling site, Michigan, USA	Jangid <i>et al.</i> (unpublished)
KN-1	Soil (suppressive to phytopathogenic fungi?)	Unspecified, but presumably in Europe	Adesina <i>et al.</i> (2007)
Toolik_Jun2005_Intertussock_k_64	Moist acidic tundra soil site, intertussock microsites dominated by mosses with small shrubs	Arctic Toolik Lake Long-Term Ecological Research	Wallenstein <i>et al.</i> (2007)
4 isolates	Bulk soil, grass-clover crop	Organic farm with arable rotation in Garderen, Gelderland, the Netherlands	Postma <i>et al.</i> (2008)
CB7 (fm206304)	Rhizosphere soil of Monterey pine (<i>Pinus radiata</i>)	Rotorua, New Zealand	Lottmann <i>et al.</i> (2010)
LM19	Decomposing beech wood from forest soil	The Netherlands	Folman <i>et al.</i> (2008)
<i>Collimonas antrihumi</i> C3-17	Natural cave	China	Lee (2018)
4 OK isolates			Varghese (unpublished)
<i>Collimonas sp.</i> PA-H2			Woyke <i>et al.</i> (unpublished)
<i>Collimonas arenae</i> 515			Schachtman (unpublished)

Plus récemment, des approches non-cultivables ont été développées pour détecter et quantifier les *Collimonas*. Notamment, une méthode de quantification de type TaqMan basée sur l'utilisation d'un couple d'amorces spécifiques du genre couplée à une sonde a été optimisée (Höppener-Ogawa *et al.*, 2007).

La combinaison des deux approches cultivables (avec ou sans enrichissement) et non-cultivables ont révélé qu'en fonction du type de sol, la quantité de *Collimonas* retrouvé fluctue mais reste proche de la limite de détection des méthodes utilisées (qPCR et métagénomique). Au maximum, les *Collimonas* représentent 0.08 % du total des bactéries du sol (Höppener-Ogawa *et al.*, 2007; Uroz *et al.*, 2014; Nicolitch *et al.*, 2019).

Le genre *Collimonas* est considéré comme faisant partie de la « biosphère rare » (Leveau *et al.*, 2010; Ballhausen *et al.*, 2015).

1.3.2. Des environnements privilégiés

A ce jour, des souches appartenant au genre *Collimonas* ont été isolées à partir de différents environnements plutôt oligotrophes²² tels que des dunes, forêts, prairies, landes, toundra, marais, grottes ou anciens sols agricoles (De Boer *et al.*, 1998b, 2001; Axelrood *et al.*, 2002; Chow *et al.*, 2002; Wilson *et al.*, 2003; De Boer *et al.*, 2004; Opelt and Berg, 2004; Aspray *et al.*, 2005; Männistö and Häggblom, 2006; Schmidt *et al.*, 2006; Adesina *et al.*, 2007; Männistö *et al.*, 2007; Uroz *et al.*, 2007; Wallenstein *et al.*, 2007; Folman *et al.*, 2008; Höppener-Ogawa *et al.*, 2008; Postma *et al.*, 2008; Lottmann *et al.*, 2010; Senechkin *et al.*, 2010; Lee, 2018) (Tableau 1.1 (Leveau *et al.*, 2010)).

L'utilisation de la méthode de qPCR décrite plus haut a permis d'appréhender la distribution du genre bactérien *Collimonas* de manière globale dans différents environnements naturels (Höppener-Ogawa *et al.*, 2007). Ces travaux ont révélé que les *Collimonas* sont principalement retrouvés au niveau des sols de prairies et forêts, et que leur population est plus abondante dans l'horizon minéral des sols par rapport à l'horizon organique. En ce qui concerne leur habitat, les *Collimonas* sont enrichis au niveau de la mycorrhizosphère ou de la minéralosphère par rapport au sol environnant (Axelrood *et al.*, 2002; Chow *et al.*, 2002; Uroz *et al.*, 2007; Lottmann *et al.*, 2010; Nicolitch *et al.*, 2016; Colin *et al.*, 2017a). De plus, Nicolitch *et al.* ont montré une diminution de l'abondance du genre *Collimonas* lors d'un apport en K et Mg

²² Environnement pauvre en nutriments inorganiques et/ou organiques

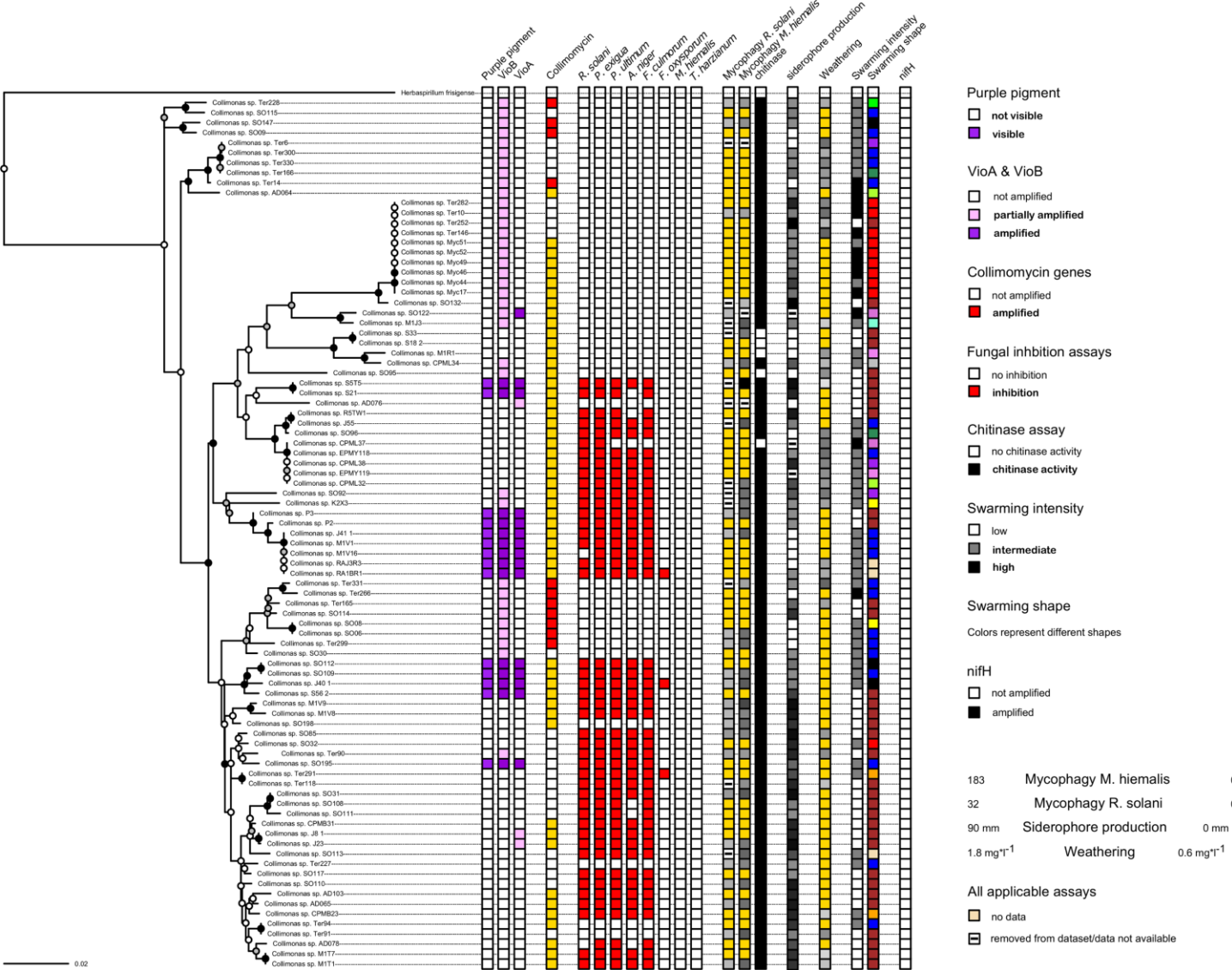


Figure 1.2 : Vue d'ensemble des différents traits phénotypiques caractéristiques des *Collimonas* (Balhausen *et al.* 2016)

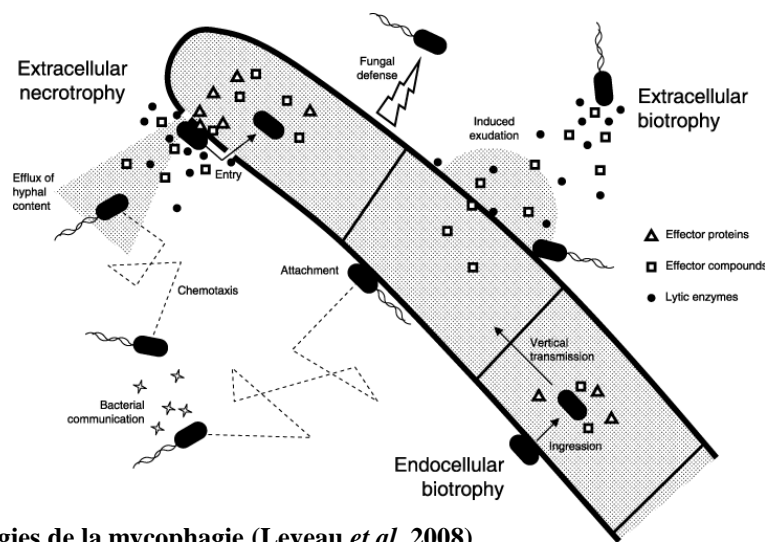


Figure 1.3 : Les trois stratégies de la mycophagie (Leveau *et al.* 2008)

Les bactéries ont développées trois stratégies pour acquérir les nutriments à partir des champignons (mycophagie) : la nécrotrophie extracellulaire, la biotrophie extracellulaire et la biotrophie intracellulaire. La nécrotrophie est la sécrétion de protéines ou toxines qui perméabilise et lyse les hyphes fongiques relarguant leur contenu intracellulaire. A l'inverse la biotrophie extracellulaire ne tue pas les hyphes fongiques, les bactéries colonisent la surface des hyphes et vivent à partir des nutriments exsudés par les champignons. Les bactéries vivant dans ces conditions sont probablement capables de survivre aux métabolites anti-bactériens produits par le champignon et de moduler le métabolisme fongique pour promouvoir la sécrétion d'exsudats. Enfin, les bactéries qui vivent dans les cellules fongiques et qui se nourrissent des nutriments directement dans le cytoplasme sont qualifiées de biotrophes intracellulaires. Dans des conditions *in vivo*, toutes ces stratégies mycophages peuvent évoluer (par exemple, un organisme biotrophe extracellulaire peut pénétrer l'hyphe et devenir intracellulaire). Il est donc difficile de les distinguer.

soulignant d'autant plus l'adaptation des *Collimonas* aux sols pauvres en nutriments (Nicolitch *et al.*, 2019).

1.4. Caractéristiques phénotypiques et génétiques

Les caractéristiques phénotypiques et génétiques ainsi que leur conservation au sein du genre *Collimonas*, ont fait l'objet de plusieurs études (Uroz *et al.*, 2009b; Mela *et al.*, 2012; Ballhausen *et al.*, 2016). On pourra noter celle de Ballhausen *et al.* où une collection de 88 souches a été étudiée. Ces travaux ont révélé que certains *Collimonas* étaient capables de produire un pigment violet (violacéine), un antibiotique (la collimomycine), un sidérophore et une chitinase et présentaient différentes activités telles qu'une activité antifongique, la mycophagie, la capacité à altérer les minéraux et la motilité « swarming ». La comparaison entre les différentes souches réalisée sur cette collection a révélé que certaines caractéristiques étaient conservées au sein du genre notamment la mycophagie, la production de sidérophore, l'altération des minéraux et la motilité « swarming » (Figure. 1.2 ; (Ballhausen *et al.*, 2016)).

Les *Collimonas* semblent donc avoir conservé leurs stratégies d'acquisition de nutriments. Les nutriments organiques proviendraient principalement des champignons (mycophagie ; §1.4.1) ou des plantes tandis que les nutriments inorganiques proviendraient des minéraux (altération des minéraux ; §1.4.2).

1.4.1. La mycophagie

La mycophagie, qui correspond à la capacité à se nourrir de champignons vivants, est une fonction particulière conservée chez les *Collimonas* (De Boer *et al.*, 1998b; Opelt and Berg, 2004; Adesina *et al.*, 2007; Höppener-Ogawa *et al.*, 2007; Kamilova *et al.*, 2007; Ballhausen *et al.*, 2015, 2016; Doan *et al.*, 2020; Leveau and Preston, 2008). On distingue trois stratégies différentes menant à la mycophagie : la nécrotrophie extracellulaire, la biotrophie extracellulaire ou la biotrophie intracellulaire (détaillées dans la Figure 1.3). Ces trois stratégies diffèrent dans les mécanismes mis en jeu mais également au niveau de la finalité pour le champignon. En effet seule la première stratégie (*i.e.*, nécrotrophie extracellulaire) engendre la mort de la cellule fongique.

C'est cette dernière stratégie qui a un intérêt particulier pour les études sur les bactéries de lutte biologique car elle inhibe le développement de champignon phytopathogène (Kamilova *et al.*,

Tableau 1.2 : Evaluation du potentiel d'alteration des minéraux de 44 souches de *Collimonas* provenant de différents environnements (Uroz *et al.* 2009b)

La souche modèle est présentée en gras, les valeurs extrêmes (rouge, maximum ; bleu, minimum) pour chaque mesure sont surlignées.

Souche	Référence	Localisation	Fer (mg/l)	pH	GA (g/l)	TCP	CAS
PML3(2)	Uroz <i>et al.</i> , 2007	Forest soil	1.26	3.50	n.d.	+	+
PML3(4)	Uroz <i>et al.</i> , 2007	Forest soil	0.95	3.43	n.d.	+	-
PML3(7)	Uroz <i>et al.</i> , 2007	Forest soil	1.56	3.48	n.d.	+	+
PML3(8)	Uroz <i>et al.</i> , 2007	Forest soil	1.52	3.46	n.d.	+	+
PMB2(3)	Uroz <i>et al.</i> , 2007	Forest soil	0.75	3.57	1.47	+	+
PMB3(1)	Uroz <i>et al.</i>, 2007	Forest soil	2.88	3.09	1.58	+	+
EPMY1(18)	Lab collection	Forest soil	1.72	3.39	n.d.	+	+
EPMY1(19)	Lab collection	Forest soil	1.38	3.15	n.d.	+	+
BPN7(2)	Lab collection	Forest soil	1.65	3.96	n.d.	+	+
BPN7(3)	Lab collection	Forest soil	0.80	3.82	n.d.	+	+
BPML7(1)	Lab collection	Forest soil	1.54	3.44	n.d.	+	+
BPML7(4)	Lab collection	Forest soil	1.47	3.90	n.d.	+	+
C2PN2(1)	Lab collection	Forest soil	0.94	3.65	n.d.	+	+
Ter 6	De Boer <i>et al.</i> , 1998, 2004	Coastal dune grassland	1.70	3.50	n.d.	+	+
Ter 10	De Boer <i>et al.</i> , 1998, 2004	Coastal dune grassland	1.71	3.43	1.62	+	+
Ter 14	De Boer <i>et al.</i> , 1998, 2004	Coastal dune grassland	1.19	3.52	1.42	+	+
Ter 90	De Boer <i>et al.</i> , 1998; 2004	Coastal dune grassland	1.40	3.46	0.74	+	+
Ter 91	De Boer <i>et al.</i> , 1998, 2004	Coastal dune grassland	1.35	3.35	n.d.	+	+
Ter 118	De Boer <i>et al.</i> , 1998, 2004	Coastal dune grassland	0.85	3.65	0.67	+	+
Ter 146	De Boer <i>et al.</i> , 1998, 2004	Coastal dune grassland	1.76	3.47	n.d.	+	+
Ter 165	De Boer <i>et al.</i> , 1998, 2004	Coastal dune grassland	1.21	3.49	n.d.	+	+
Ter 166	De Boer <i>et al.</i> , 1998, 2004	Coastal dune grassland	1.28	3.40	1.49	+	+
Ter 228	De Boer <i>et al.</i> , 1998, 2004	Coastal dune grassland	1.12	3.57	n.d.	+	+
Ter 252	De Boer <i>et al.</i> , 1998, 2004	Coastal dune grassland	0.98	3.48	n.d.	+	+
Ter 282	De Boer <i>et al.</i> , 1998, 2004	Coastal dune grassland	1.54	3.45	1.24	+	+
Ter 300	De Boer <i>et al.</i> , 1998, 2004	Coastal dune grassland	1.07	3.43	1.49	+	+
Ter 330	De Boer <i>et al.</i> , 1998, 2004	Coastal dune grassland	1.49	3.46	n.d.	+	+
Ter 331	De Boer <i>et al.</i> , 1998, 2004	Coastal dune grassland	1.76	3.48	1.42	+	+
R35512	Höppener-Ogawa <i>et al.</i> , 2007	River dune	1.30	3.36	n.d.	+	+
R35513	Höppener-Ogawa <i>et al.</i> , 2007	Heathland	1.56	3.36	n.d.	+	+
R35514	Höppener-Ogawa <i>et al.</i> , 2007	Heathland	1.37	3.41	0.92	+	-
R35515	Höppener-Ogawa <i>et al.</i> , 2007	Heathland	1.51	3.36	1.80	+	+
RAJ3R1	Männistö and Häggblom, 2006	boreal oligotrophic forest soil	1.15	3.70	2.00	+	+
M2TIA	Männistö and Häggblom, 2006	Mire pond sediment	1.26	3.62	2.00	+	+
K2X3	Männistö and Häggblom, 2006	boreal oligotrophic forest soil	1.24	3.39	1.98	+	+
RA1BR1	Männistö and Häggblom, 2006	boreal oligotrophic forest soil	1.13	3.44	1.81	+	+
M1J3	Männistö and Häggblom, 2006	Arctic tundra soil	0.77	3.49	1.75	+	+
K2E1	Männistö and Häggblom, 2006	boreal oligotrophic forest soil	1.17	3.45	1.86	+	+
M1R1	Männistö and Häggblom, 2006	Arctic tundra soil	1.27	3.76	1.74	+	+
M1T7	Männistö and Häggblom, 2006	Arctic tundra soil	0.71	3.59	1.78	+	+
S5T5	Männistö and Häggblom, 2006	Arctic tundra soil	0.60	3.60	1.94	+	+
M1T1	Männistö and Häggblom, 2006	Arctic tundra soil	0.87	3.60	n.d.	+	+
R5TN1	Männistö and Häggblom, 2006	boreal oligotrophic forest soil	1.35	3.43	2.75	+	+
K1E3	Männistö and Häggblom, 2006	boreal oligotrophic forest soil	0.79	3.55	n.d.	+	+
S1E3	Männistö and Häggblom, 2006	Arctic tundra soil	1.25	3.47	n.d.	+	+

2007; Doan *et al.*, 2020). Mais on constate que cette stratégie nécrotrophique n'est pas conservée au sein du genre (Ballhausen *et al.*, 2016).

1.4.2. L'altération des minéraux

1.4.2.1. L'altération des minéraux est-elle un trait fonctionnel du genre bactérien *Collimonas* ?

Le criblage de nombreuses collections de souches bactériennes provenant de différents sites et compartiments (sol, rhizosphère, minéralosphère...) a permis de mettre en évidence la structuration des communautés bactériennes vis-à-vis de la capacité à altérer les minéraux et la relation entre appartenance taxonomique et potentiel fonctionnel. Ces travaux ont notamment permis de mettre en lumière que les représentants du genre *Collimonas* étaient souvent plus efficaces pour cette fonction que les autres genres bactériens détectés. Ces observations ont donné lieu à des analyses plus ciblées sur ce genre. La capacité d'altération des minéraux a ainsi été évaluée sur une collection de 45 souches appartenant au genre bactérien *Collimonas* (Uroz *et al.*, 2009b) provenant de sols forestiers (Uroz *et al.*, 2007), de dunes (De Boer *et al.*, 2004, 1998b), de landes (Höppener-Ogawa *et al.*, 2007), de la toundra arctique et de sédiments de mare (Männistö *et al.*, 2007). L'altération des minéraux a été mesurée *via* trois biotests différents (Uroz *et al.*, 2009b) : i) un biotest en microplaque en présence d'un minéral naturel (biotite) où la capacité d'altération est déterminée par la quantité de fer libérée et la baisse du pH, ii) le test TCP où la capacité d'altération est déterminée par la formation d'un halo autour de la colonie et qui correspond à la solubilisation du phosphate, et iii) le test CAS où la capacité d'altération est déterminée par la formation d'un halo autour de la colonie et qui correspond à la mobilisation du fer. Le premier test utilise un minéral complexe (la biotite) tandis que le test TCP utilise du phosphate tricalcique (en général dérivé d'hydroxyapatite) et le test CAS mime la structure d'un minéral au travers de la formation d'une structure artificielle entre le Chromazurol S et le fer. Le test TCP est plus simple à mettre en application et donne des conclusions similaires au test biotite.

L'utilisation du test biotite a révélé que toutes les souches de *Collimonas* testées étaient efficaces dans l'altération et capables de libérer de 0.60 à 2.88 mg/l de fer à partir de la biotite (Tableau 1.2). Ces valeurs obtenues après deux jours d'incubation sont comparativement élevées par rapport aux souches bactériennes d'autres genres (Uroz *et al.*, 2009b). Toutes les souches de *Collimonas* acidifient le milieu de culture (BHM glucose), passant d'un pH initial

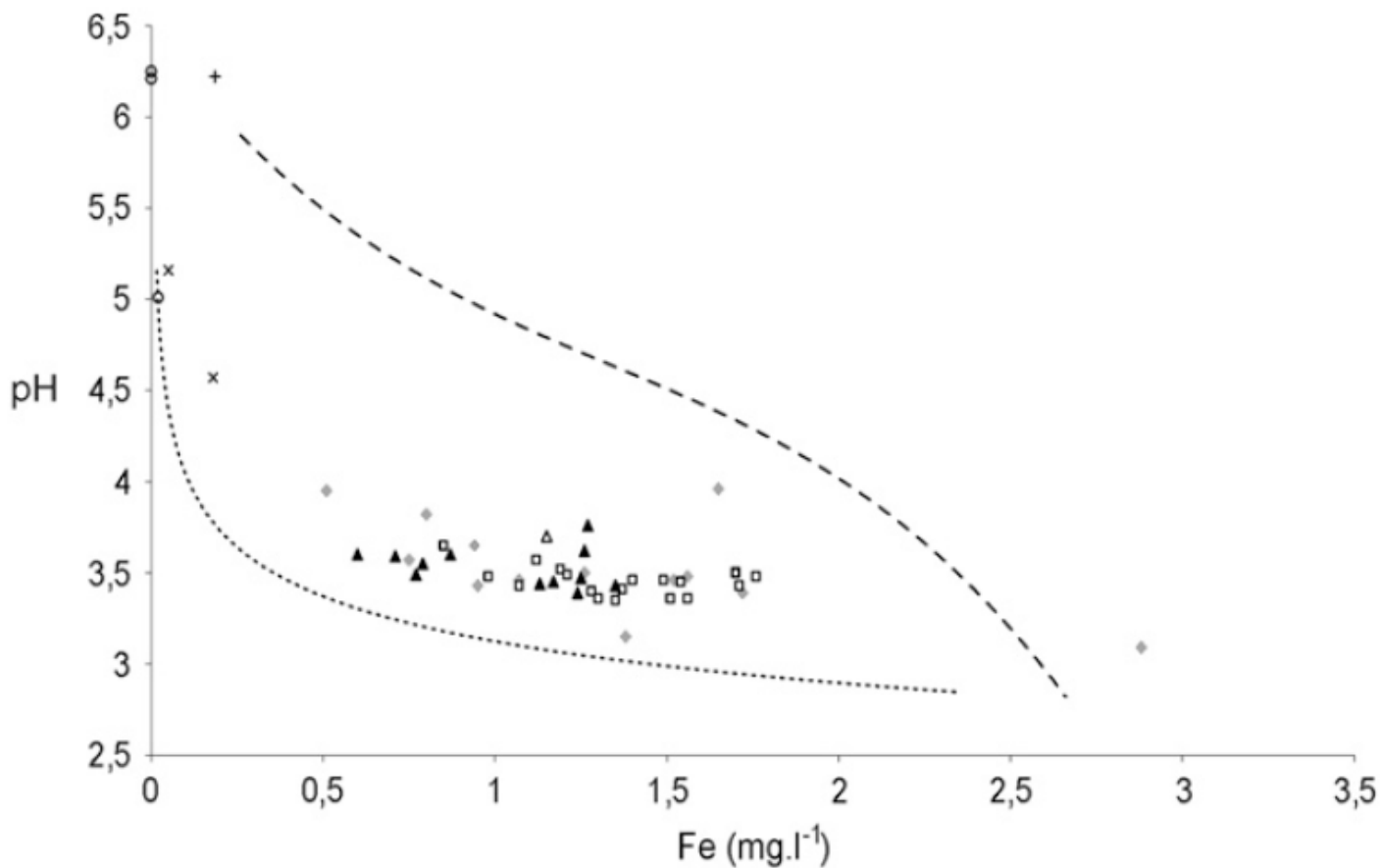


Figure 1.4 : Relation entre l'origine écologique des souches bactériennes et leur capacité d'altération des minéraux (Uroz et al. 2009b)

Chaque symbole représente une souche de *Collimonas* provenant des Pays-Bas (prairies dunaires côtières, prairies dunaires fluviales, bruyère; carrés blancs), de France (sol forestier acide; losanges gris) et de Finlande (sol de forêt boréale oligotrophe, sédiments d'étang de mare, sol de toundra arctique; triangles noirs). Les deux courbes indiquent l'effet d'un agent complexant (acide citrique ; ligne supérieure) et un acide fort (acide chlorhydrique ; ligne inférieure) sur l'altération de la biotite. Le sidérophore synthétique c'est-à-dire le DFAM (déferroxamine) est représenté par le signe plus. Les souches de *Herbaspirillum* et *Janthinobacterium* sont indiquées par un cercle blanc et une croix, respectivement.

de 6.5 jusqu'à environ 3.0. Sur le milieu TCP ces souches sont toutes capables de former un halo de solubilisation du phosphate. Enfin, elles sont toutes capables de mobiliser le fer sur le milieu CAS sauf deux souches nommées PML3(4) et R35514. **De façon intéressante, la souche PMB3(1) est la plus efficace pour altérer la biotite et à acidifier le milieu par rapport aux 44 autres.**

Ces résultats démontrent que la capacité à altérer les minéraux est une fonction conservée au sein du genre *Collimonas* (Ballhausen *et al.*, 2016; Uroz *et al.*, 2009b). Néanmoins, on observe des différences d'efficacité en fonction des espèces et de l'origine des souches. Ces conclusions nécessitent encore d'être confirmées par le criblage d'autres souches. Néanmoins, les travaux de Uroz *et al.* ont révélé que les souches provenant de la toundra arctique étaient significativement moins efficaces pour altérer la biotite par rapport aux souches provenant de sols forestiers acides et de dunes. Ces différences pourraient s'expliquer par des variations génétiques mais aussi par les conditions biogéochimiques du milieu dans lequel ces souches évoluent. Ces travaux suggèrent que les environnements pauvres en nutriments inorganiques favorisent l'émergence de mécanismes d'altération plus efficaces.

1.4.2.2. Acidolyse ou complexolyse ?

Toutes les souches de *Collimonas* altèrent-elles les minéraux par le même mécanisme ?

Pour répondre à cette question, le résultat des biotests avec biotite pour chaque souche a été comparé à deux composés contrôles qui illustrent des mécanismes d'altération différents (*i.e.*, acidolyse et complexolyse). L'altération de la biotite en présence d'un acide fort (HCl) a été mesurée permettant de mimer un mécanisme d'acidolyse. A l'inverse, le citrate a été utilisé pour mimer un mécanisme d'acido-complexolyse.

Dans les conditions testées (milieu BHm avec glucose), la majorité des souches de *Collimonas* testées se regroupe au niveau de la courbe de l'acide chlorhydrique (Figure 1.4), suggérant que les bactéries appartenant au genre *Collimonas* agissent préférentiellement par acidolyse. Cette observation est en accord avec la capacité de toutes les souches à solubiliser le phosphate sur TCP. En effet, ce phénotype est principalement dû à des processus d'acidification (Goldstein, 1995).

Tableau 1.3 : Effet de la source de carbone sur l'efficacité d'altération des minéraux (Uroz *et al.* 2009b)

Chaque source de carbone a été testée à 2 g/l.

Pour chaque souche bactérienne, les lettres différentes indiquent que la quantité de fer libéré ou le pH est significativement différent en fonction de la source de carbone.

	Fer libéré à partir de biotite (mg/l)				pH			
	Glucose	Mannitol	Tréhalose	Gluconate	Glucose	Mannitol	Tréhalose	Gluconate
<i>Collimonas</i>								
PML3(2)	1.26a	0.29b	0.26b	0c	3.50a	4.31b	4.43c	6.22d
PML3(4)	0.96a	0.02b	0c	0c	3.43a	4.86b	6.22c	6.22c
PML3(7)	1.56a	0.27b	0c	0c	3.48a	4.54b	6.22c	6.22c
PML3(8)	1.52a	0.30b	0.84c	0d	3.46a	4.69b	4.77c	6.22d
PMB2(3)	0.75a	0.31b	0.80c	0d	3.57a	4.18b	4.79c	6.22d
PMB3(1)	2.88a	0.32b	0.15c	0d	3.09a	4.42b	5.05c	6.22d
S1E3	1.25a	1.18a	0.30b	0c	3.47a	4.75b	4.49c	6.22d
K2E1	0.90a	1.16b	0c	0c	3.53a	4.72b	6.22c	6.22c
K2X3	1.24a	1.11a	0.28b	0c	3.41a	4.93b	4.43c	6.22d
Ter330	1.49a	0.90b	0.22c	0d	3.46a	4.83b	4.43c	6.22d
Ter166	1.28a	1.16a	0.23b	0c	3.41a	4.86b	4.44c	6.22d
Ter165	1.21a	1.16b	0.54c	0d	3.49a	4.86b	3.97c	6.22d
Ter91	1.35a	1.26a	0.58b	0c	3.35a	4.82b	4.20c	6.22d
R35513	1.56a	1.06b	0.02c	0c	3.36a	4.77b	6.22c	6.22c
R35512	1.30a	1.26a	0.31b	0c	3.36a	4.83b	5.04c	6.22d
R35515	1.51a	1.09b	0.21c	0d	3.36a	4.77b	4.45c	6.22d
<i>Burkholderia</i>								
PML1(4)	1.86a	0.24b	0c	0c	3.33a	4.20b	6.23c	6.22c
PML1(12)	1.66a	0.11b	0c	0c	3.37a	4.83b	6.23c	6.22c
PN3(3)	0a	0a	0a	0a	6.23a	6.23a	6.23a	6.22a

1.4.2.3. La source de carbone a-t-elle un effet sur le potentiel d'altération ?

Du fait de leur écologie, il est attendu que les souches de *Collimonas* aient d'autres sources de C à métaboliser que le glucose. Les *Collimonas* sont-ils capables d'altérer les minéraux en présence d'autres sources de carbone ?

Pour répondre à cette question, des tests d'altération ont été réalisés sur des souches de *Collimonas* en présence de glucose, mannitol, tréhalose et gluconate. Le glucose, source de carbone majoritaire dans le sol, provient des exsudats racinaires et de la dégradation de polymères complexes (cellulose). Le gluconate est un dérivé du métabolisme du glucose. A l'inverse le mannitol et le tréhalose sont des composés de réserve produits par les champignons. Le criblage de cette collection a révélé que toutes les souches sont plus efficaces en présence de glucose par rapport aux autres sources de carbone testées. La comparaison réalisée entre souches de *Collimonas* et de *Burkholderia* a révélé qu'en présence de mannitol les souches de *Collimonas* étaient plus efficaces que les souches de *Burkholderia*. De manière notable, la plupart des souches de *Collimonas* altèrent la biotite en présence de tréhalose, ce qui n'est pas le cas des souches de *Burkholderia* (Tableau 1.3 (Uroz *et al.*, 2009b)). Aucune altération n'est observée en présence de gluconate quelle que soit la souche testée.

Les *Collimonas* sont donc capables d'altérer les minéraux en présence de différentes sources de carbone (provenant de la rhizosphère ou de la mycorrhizosphère) contrairement à d'autres genres bactériens.

1.4.2.4. Quels sont les déterminants génétiques de l'altération des minéraux par les *Collimonas* ?

Une étude de génomique comparative de 5 souches de *Collimonas* (Ter331, Ter14, Ter6, Ter91, Ter10) a été réalisée dans le but de mieux comprendre la variabilité phénotypique du genre (Mela *et al.*, 2012). Différents gènes et clusters conservés ont été identifiés pour des fonctions telles que la production de sidérophore, la mobilité, mais aucun n'a été clairement lié à l'altération des minéraux. Les auteurs de cette étude ont néanmoins souligné la présence d'un gène codant pour une potentielle quinoprotéine²³, mais aucune démonstration fonctionnelle n'a été réalisée. Cette hypothèse est basée sur le fait que le mécanisme moléculaire de l'altération

²³ Protéine utilisant le cofacteur PQQ

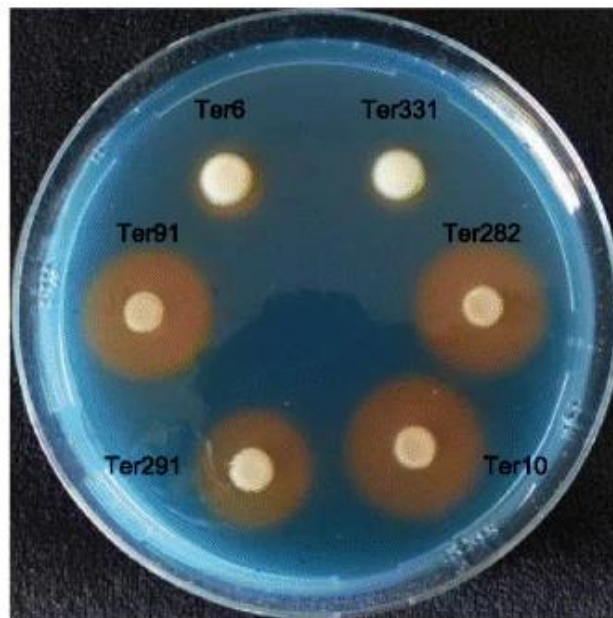
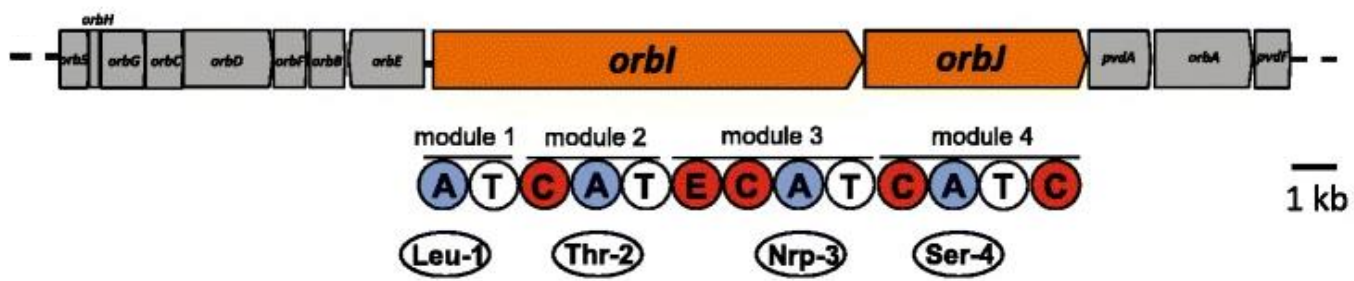
A**B**

Figure 1.5 : Analyse de la production de sidérophore au niveau phénotypique et génomique des souches de *Collimonas* Ter6, Ter331, Ter282, Ter10, Ter291 et Ter91 (Song *et al.* 2015)

(A) Production de sidérophore évaluée par le biotest CAS solide par les souches de *Collimonas* Ter331, Ter6, Ter91, Ter291, Ter10 et Ter282. Un halo orange indique la chélation du fer par un chélateur tel qu'un sidérophore. (B) Représentation du cluster de gène potentiellement impliqué dans l'acquisition du fer par les souches de *Collimonas*. Les gènes représentés en orange codent pour des NRPS. La prédiction des acides aminés recrutés par chaque module du NRPS est indiquée en bas.

des minéraux le plus décrit dans la littérature est lié à l'activité d'une quinoprotéine à savoir une glucose déshydrogénase PQQ-dépendante (INTRODUCTION §4.1.3). Néanmoins, une analyse BLASTP (NCBI) réalisée sur la séquence protéique de cette quinoprotéine ne révèle pas d'homologie de séquence avec une GDH-PQQ. De plus, aucun gène de synthèse du cofacteur PQQ n'a été retrouvé dans les génomes des souches de *Collimonas* testées. Ces observations amènent plusieurs questions (i) quels sont les gènes impliqués dans l'altération des minéraux par les *Collimonas* s'ils ne possèdent pas de GDH-PQQ ni de gènes de synthèse de PQQ ? (ii) quelle est la réelle activité de cette potentielle quinoprotéine et son implication dans l'altération des minéraux ?

Le biotest CAS a révélé que la plupart des souches de *Collimonas* sont capables de produire des molécules chélatrices. L'analyse génomique de 6 souches de *Collimonas* (Ter331, Ter6, Ter91, Ter291, Ter10, Ter282) a permis d'identifier un cluster de 13 gènes (dont deux codant des NRPS) potentiellement impliqués dans la synthèse de sidérophore, ce qui pourrait confirmer les résultats de biotest (Figure 1.5 (Song *et al.*, 2015)). Les prédictions bioinformatiques de ce cluster NRPS identifient le sidérophore produit comme de l'ornibactine. Cependant, ce ne sont que des prédictions et aucune caractérisation chimique n'a été réalisée. De plus, l'implication dans l'altération des minéraux de l'ornibactine n'a jamais été démontrée.

1.5. Pourquoi le genre *Collimonas* est-il un bon modèle d'étude ?

Ma thèse porte sur l'altération des minéraux par les bactéries dans un contexte de promotion de la croissance des arbres en forêt. De ce fait, le genre bactérien *Collimonas* est un modèle de choix. En effet, il est adapté aux environnements oligotrophes comme les sols forestiers et est enrichi au niveau de la mycorrhizosphère. Il est capable de former des relations étroites avec les champignons mycorrhiziens (mycophagie). Son écologie en fait donc un modèle pertinent pour mes travaux de thèse.

De plus, nous avons vu (§1.4.2) que la fonction d'altération des minéraux était un trait fonctionnel pour le genre *Collimonas*. Néanmoins, des différences existent entre les souches de *Collimonas*. La comparaison de ces souches et de leur génome pourrait être réalisée pour étendre la découverte des mécanismes moléculaires de l'altération au niveau de ce genre.

Enfin, les *Collimonas* sont capables d'altérer les minéraux en présence de différentes sources de carbone provenant de la rhizosphère ou de la mycorrhizosphère (§1.4.2.3). On pourra noter par exemple le cas du tréhalose avec lequel les souches de *Collimonas* sont capables d'altérer

Tableau 1.4 : Caractéristiques physico-chimiques du sol d'où provient la souche de *Collimonas pratensis* PMB3(1) (Calvaruso *et al.* 2007)

Le compartiment rhizosphérique correspond au sol qui a été spontanément retiré des racines du chêne (diamètre <2 mm) après 3 jours à 30°C.

Les nombres entre parenthèses correspondent à l'écart type.

Compartiment du sol	Profondeur (cm)	pH (eau)	Distribution des minéraux en fonction de leur taille (%)				C %	N ‰	Cations échangeables cmolc/kg				unité de saturation basique
			Argile	Limon fin	Limon grossier	Sable fin			Ca	Mg	K	Fe	
Sol environnant	0-3	4.1	19.4	17.5	4.8	10.2	n.d.	n.d.	0.7	0.5	0.9	0.3	15 (4)
		(0.2)							1.3	0.8	2.0	0.6	
Rhizosphère	0-3	4.1	19.1	17.5	5.2	10.0	n.d.	n.d.	(0.6)	(0.2)	(0.5)	(0.1)	25 (6)
		(0.2)							4.0	0.2	0.3	0.6	
Sol environnant	3-10	4.3	20	17.3	3.5	11.1	68 (8)	(0.4)	(0.1)	(0.2)	(0.2)	(0.1)	8 (2)
		(0.2)							4.9	0.3	0.4	1.6	
Rhizosphère	3-11	(0.2)	20.5	16.9	2.3	12.1	83 (9)	(0.4)	(0.1)	(0.2)	(0.4)	(0.2)	16 (3)

contrairement à d'autres souches telles que les *Burkholderia*. Cela suggère que ce genre bactérien est particulièrement efficace pour altérer dans différents environnements et qu'il possède des mécanismes d'altération probablement différents et/ou absents chez les *Burkholderia*.

2. Focus sur la souche *Collimonas pratensis* PMB3(1)

2.1. Origine

La souche modèle utilisée dans ma thèse (la souche PMB3(1)) fait partie d'une collection de souches réalisée à partir d'un prélèvement de sol dans la forêt de Breuil Chenue (détails des caractéristiques physicochimiques du sol dans le tableau 1.4 (Calvaruso *et al.*, 2007)). Elle provient plus précisément du manteau fongique de *Scleroderma citrinum* (champignon ectomycorrhizien) associé aux racines d'un chêne (Uroz *et al.*, 2007). La souche PMB3(1) étant particulièrement efficace pour altérer les minéraux (comparé aux autres souches de la collection), elle a été choisie comme modèle dans différentes études et pour ma thèse.

2.2. Analyses préliminaires

Pour le bon déroulé de ma thèse, des analyses préliminaires ont été nécessaires afin de mieux caractériser génétiquement et phénotypiquement cette souche et notamment ses conditions de culture, sa résistance aux antibiotiques, son métabolisme, sa capacité à altérer les minéraux et sa production de sidérophore.

2.2.1. Matériels et méthodes

2.2.1.1. Analyses moléculaires

Après l'analyse de la séquence du gène *rrs* codant l'ARNr 16S, la souche a été assignée au genre *Collimonas* et plus récemment à l'espèce *pratensis* grâce à une hybridation ADN-ADN *in silico* (GGDC).

Le génome de cette souche modèle a été séquencé, assemblé et annoté sur la plateforme RAST (Aziz *et al.*, 2008). C'est à partir de cette première analyse (RAST) que se base la publication de l'annonce du séquençage du génome (§3.1 (Picard *et al.*, 2020)). En parallèle, le génome a été annoté par MAGE (Vallenet, 2006; Vallenet *et al.*, 2009), un outil plus visuel et informatif que j'ai utilisé principalement pendant ma thèse.

2.2.1.2. Préparation d'un inoculum calibré de la souche PMB3(1)

La souche *C. pratensis* PMB3(1) est conservée dans un stock de glycérol 40 % à -80 °C. La mise en culture passe par une préculture en milieu AB mannitol (ABm) solide [pour 1L ; K₂HPO₄ : 3 g ; NaH₂PO₄ : 1 g ; NH₄Cl : 1 g ; MgSO₄.7H₂O : 0.3 g ; KCl : 0.15 g ; CaCl₂ : 0.01 g ; FeSO₄.7H₂O : 2.5 mg ; mannitol : 2 g] (Chilton *et al.*, 1974) (Annexe 2). Après 2 jours de culture à 25 °C, une colonie bactérienne est prélevée pour inoculer 50 ml de milieu ABm liquide. La culture est incubée à 25 °C sous agitation (150 rpm) pendant 2 jours. La culture est ensuite centrifugée à 8000 g, 15 min, 10 °C. Le culot bactérien est lavé 3 fois dans 10 ml d'eau mQ stérile (pas de solution saline car inadaptée aux impératifs expérimentaux) et est resuspendu dans de l'eau mQ stérile. La DO_(595 nm) est ensuite ajusté à 0.9 ou 1.

2.2.1.3. Tests de croissance

Le test a été réalisé en microplaque de 96 puits contenant 10 µl de suspension bactérienne (DO_(595 nm) = 0.9) inoculés dans 190 µl de milieu LBm [pour 1L ; peptone 10 g ; extrait de levure : 5 g ; NaCl : 5 g] (Dransart, 1995) ou ABm (Annexe 2). La microplaque a été incubée à 25 °C sous agitation orbitale (Tecan infinite M200 pro) pendant 5 jours. L'absorbance à 600 nm a été mesurée toutes les 3h. Chaque condition a été effectuée en triplicat et des contrôles de milieu non-inoculés ont été réalisés.

2.2.1.4. Antibiogramme

Le milieu LBm gélosé a été utilisé avec ou sans antibiotiques et à des concentrations finales différentes (ampicilline [100, 150, 200 µg/ml] ; tétracycline [20, 50, 100 µg/ml] ; spectinomycine [50, 100, 200 µg/ml] ; streptomycine [100, 150, 200 µg/ml] ; gentamycine [20, 50, 100, 150 µg/ml] ; kanamycine [50, 100, 150, 200 µg/ml] ; chloramphénicol [25, 50, 100, 150, 200 µg/ml]).

A partir de la suspension bactérienne (DO_(595 nm) = 1), une cascade de dilutions au dixième a été réalisée jusqu'à la dilution 10⁻⁷ dans de l'eau stérile. Pour chaque condition, des gouttes de 10 µl de suspension pour chaque dilution ont été déposées sur le milieu gélosé. Après 2 et 5 jours de croissance à 25 °C, le nombre de colonies a été compté pour chaque goutte en comptant uniquement les gouttes qui présentaient un nombre de colonies entre 3 et 30.

2.2.1.5. Le métabolisme

Une microplaque BIOLOG GN2 Gram Negative a été utilisée pour évaluer les différentes sources de carbone utilisées par la souche modèle. Le protocole du fabricant a été appliqué.

2.2.1.6. Le potentiel d'altération des minéraux

Le potentiel d'altération a été mesuré par différents biotests mimant la structure d'un minéral (*i.e.*, TCP et CAS). Le milieu TCP permet d'observer les mécanismes liés à l'acidolyse tandis que le CAS est plutôt lié à la complexolyse. Les résultats fournis par le milieu TCP sont proches de ceux obtenus lors de biotests avec des minéraux complexes (test avec biotite), il a donc été utilisé comme méthode de crible dans plusieurs études et ma thèse.

Solubilisation du phosphate inorganique : le milieu TCP (Phosphate TriCalcique)

Le milieu TCP (Annexe 2) est un milieu ayant pour seule source de phosphate du $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ qui est insoluble (milieu opaque). Lorsqu'une souche qui se développe est en capacité de solubiliser le phosphate inorganique, on observe la formation d'un halo transparent. En mesurant ce halo on peut alors quantifier la capacité de solubilisation du phosphate de la souche testée.

Trois gouttes de 5 μl de suspension bactérienne ($\text{DO}_{(595\text{ nm})} = 0.9$) ont été inoculées sur le milieu TCP. Après 3 et 7 jours d'incubation à 25 °C, le diamètre des halos et des colonies a été mesuré. Pour évaluer l'acidification de ce milieu par la souche modèle, dans une microplaque de 96-puits, 5 μl de suspension ($\text{DO}_{(595\text{ nm})} = 0.9$) ont été inoculés dans 195 μl de milieu TCP liquide (dépourvu de phosphate tricalcique pouvant tamponner le milieu). Après 3 jours d'incubation à 25 °C, la microplaque est centrifugée à 5000 g, 15 min et 180 μl du surnageant est ajouté à 20 μl de vert de bromocrésol (1 g/l ; indicateur de pH coloré ; jaune = acide ; bleu = neutre). L'absorbance est mesurée à 595 nm.

Mobilisation du fer : le milieu CAS (Chrome Azurol S)

Le milieu CAS est un milieu de culture composé de [pour 1L ; PipeNa_2 : 34,63 g, KH_2PO_4 : 0,3 g, NaCl : 0,5 g, NH_4Cl : 1 g, $\text{MgSO}_4,7\text{H}_2\text{O}$: 0,246 g, $\text{CaCl}_2,2\text{H}_2\text{O}$: 0,0147 g, Glucose : 4 g, Chrome Azurol S : 0,0905 g, FeCl_3 : 0,0024 g, HDTMA : 0,1640 g ; pH = 6,8] (Annexe 2). Ce milieu initialement bleu devient orange lorsque le fer est mobilisé suite à l'action de chélateurs

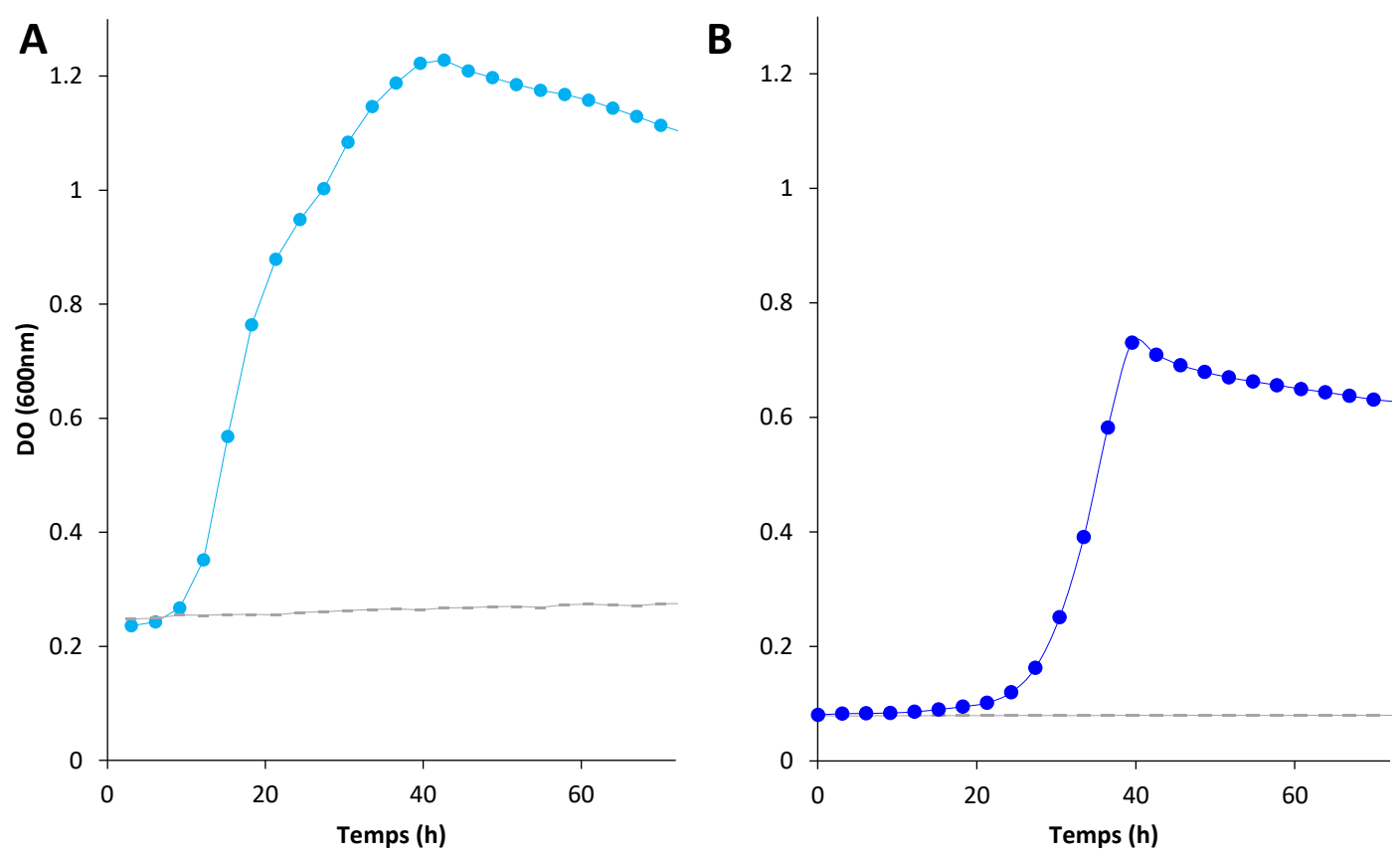


Figure 1.6 : Courbe de croissance de la souche PMB3(1) dans deux milieux différents

Courbe de croissance de la souche de *Collimonas pratensis* PMB3(1) (bleu) ou du contrôle non-inoculé (gris) dans le milieu LBm (A) ou ABm (B).

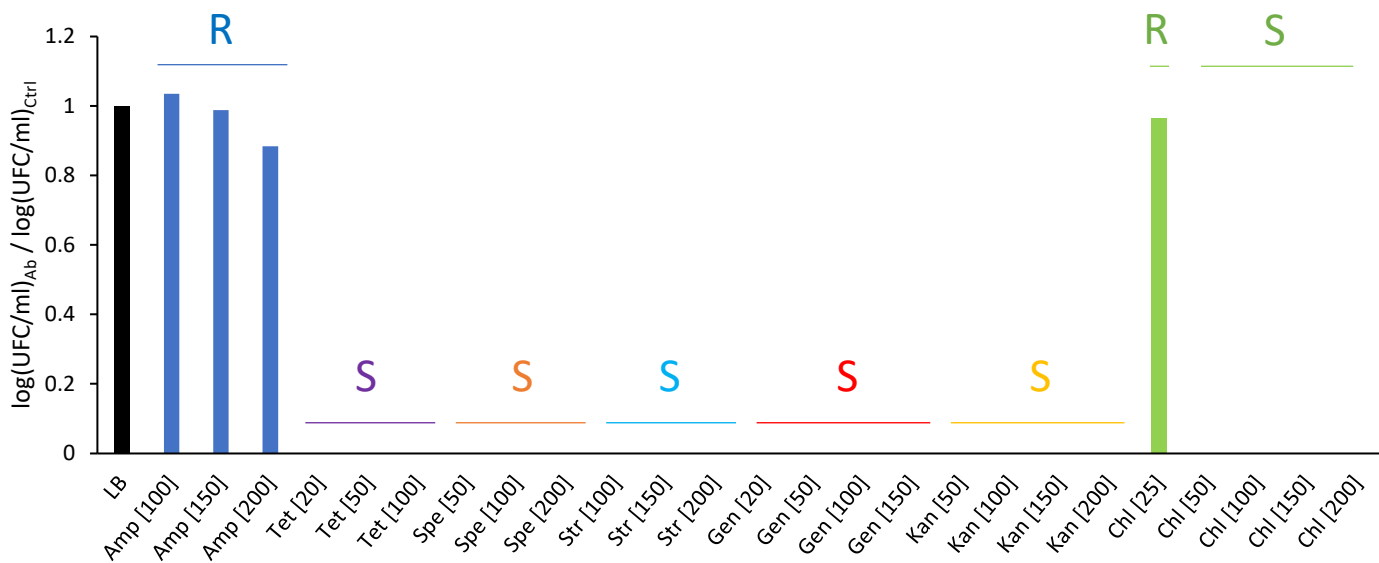


Figure 1.7 : Antibiogramme de la souche PMB3(1)

Le rapport du logarithme de la concentration bactérienne obtenue après 2 jours de culture (en UFC/ml) en présence d'antibiotique comparé au contrôle sans antibiotique est représenté. Le contrôle sans antibiotique est présenté en noir. La concentration (en µg/ml) pour chaque antibiotique (ampicilline (Amp), tétracycline (Tet), spectinomycine (Spe), Streptomycine (Str), gentamycine (Gen), Kanamycine (Kan), Chloramphénicol (Chl)) est indiquée entre crochet. La sensibilité à chaque antibiotique est indiquée par les lettres R et S pour respectivement résistant et sensible.

comme les sidérophores sur le complexe CAS(Fe). La mesure d'un halo orange permet de quantifier la capacité de mobilisation du fer de la souche testée.

Trois gouttes de 5 µl de suspension bactérienne ($DO_{(595\text{ nm})} = 0.9$) ont été déposées sur le milieu CAS. Après 3 et 7 jours d'incubation à 25 °C, le diamètre des halos et des colonies a été mesuré.

2.2.2. Résultats

2.2.2.1. Croissance

La souche a une température optimale de croissance de 25 °C, elle est classiquement cultivée pendant 48h dans le milieu LBm ou ABm même si elle est capable de croître sur d'autres milieux (BHm, TCP ou CAS). Son temps de doublement en milieu riche est d'environ 5h (Figure 1.6). Sur milieu LBm, les colonies sont blanches à jaunâtres, circulaires et muqueuses.

2.2.2.2. Antibiogramme

Pour déterminer la résistance aux antibiotiques classiquement utilisés en laboratoire (chloramphénicol, ampicilline, tétracycline, gentamycine, kanamycine, spectinomycine, streptomycine), un antibiogramme a été réalisé sur la souche modèle PMB3(1) (Figure 1.7). D'après l'analyse de ces résultats, la souche de *Collimonas pratensis* PMB3(1) est résistante à l'ampicilline (100, 150 et 200 µg/ml) et au chloramphénicol (uniquement à 25 µg/ml). La souche modèle est sensible aux autres antibiotiques testés (tétracycline, gentamycine, kanamycine, spectinomycine, streptomycine) pour les concentrations testées.

Ces données permettront d'élaborer des stratégies de mutagenèse par insertion d'un gène de résistance à un antibiotique.

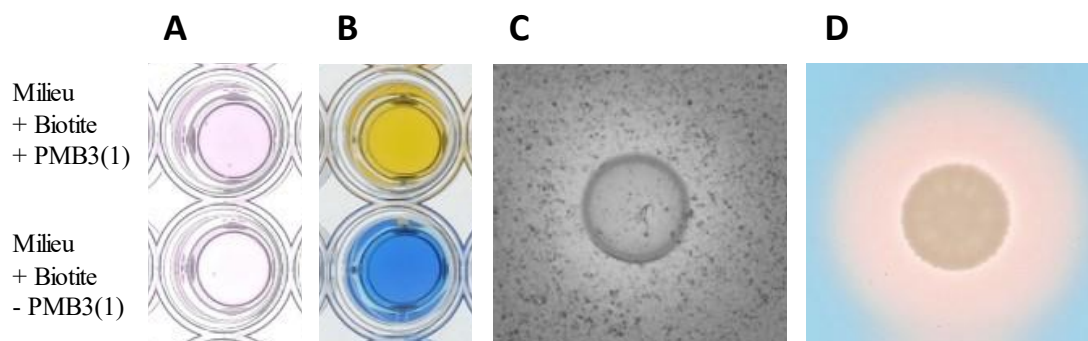
2.2.2.3. Le métabolisme

La souche modèle est capable de métaboliser différents sucres tels que le glucose, galactose, fructose, maltose et rhamnose. Ces derniers sont fréquemment retrouvés dans la rhizosphère tout comme les acides aminés alanine et asparagine ou les acides aspartique et succinique (INTRODUCTION §3.1.1). A l'inverse, PMB3(1) est capable de métaboliser des sucres provenant de l'environnement fongique comme le mannitol et le tréhalose mais pas le N-acétyl-D-glucosamine qui est pourtant un constituant et un dérivé de la chitine (Tableau 1.5).

Tableau 1.5 : Certains sucres métabolisés ou non par la souche PMB3(1) d'après les résultats des plaques BIOLOG

L'origine écologique de certains composés est indiquée par un code couleur : rouge pour les composés rhizosphérique et vert pour les composés mycorrhizosphériques.

Composé métabolisé	DO à 600 nm
a D Glucose	0.727
L-Glutamic acid	0.614
L-Proline	0.567
D-galactose	0.499
D-Fructose	0.492
Glycyl L Glutamic acid	0.37
L-Asparagine	0.363
D Trehalose	0.303
L-Aspartic acid	0.268
D-Mannitol	0.26
D Glucose 6 Phosphate	0.202
D,L Lactic acid	0.188
D Gluconic acid	0.179
D-Mannose	0.172
L-Threonine	0.151
L alanine	0.144
Succinic acid	0.128
D gluconic acid	0.113
Glycogene	0.105
D glucosaminic acid	0.087
D Sorbitol	0.076
a Ketoglutaric acid	0.065
D-Saccharic acid	0.057
D galacturonic acid	0.056
L-Ornithine	0.034
D,L a Glycerol Phosphate	0.03
Maltose	0.029
Sucrose	0.029
Xylitol	0.029
a D Lactose	0.028
D-Serine	0.028
D-Cellobiose	0.025
Putrescine	0.024
L-Rhamnose	0.022
L-Arabinose	0.018
N-acetyl-D-Glucosamine	0.014
N-acetyl-D-Galactosamine	0.009
Glycerol	0
eau	0

**Figure 1.8 : Potentiel d'altération de la souche PMB3(1)**

Libération de fer à partir de biotite au bout de 7 jours par la souche sauvage et le contrôle négatif (milieu non-inoculé contenant de la biotite) dans le milieu BHm glucose (2 g/l). La concentration en fer est mesurée au ferrospectral, l'absorbance à 595 nm est mesurée. Plus le produit de réaction est rose, plus la concentration en fer est importante (A). Mesure du pH du surnageant au vert de bromocrésol (1g/l ; indicateur coloré). L'absorbance est mesurée à 595nm. Une couleur jaune indique un pH acide tandis qu'une couleur bleue indique un pH neutre (B). Solubilisation de phosphate à partir de TCP au bout de 7 jours (C). Mobilisation du fer sur le milieu CAS solide au bout de 7 jours (D).

2.2.2.4. Le potentiel d'altération

Sur le test en microplaque, la souche modèle est capable de libérer 2.88 mg/l de fer à partir de biotite dans le milieu BHm supplémenté avec 2 g/l de glucose, l'acidité du milieu étant de 3.09 après les 2 jours d'incubation (Figure 1.8AB) (Uroz *et al.*, 2009b).

Elle est capable de former un halo de 0.8 cm de diamètre après 7 jours de culture sur le milieu TCP indiquant sa capacité à solubiliser le phosphate inorganique (Figure 1.8C). La mesure du pH dans le milieu TCP liquide après 3 jours de culture indique une diminution du pH de 6.5 à 4.0.

Enfin, la souche bactérienne PMB3(1) présente un halo orange de 1.5 cm de diamètre sur le milieu CAS. La souche PMB3(1) est donc capable de mobiliser le fer à partir de CAS suggérant la production de sidérophores (Figure 1.8D).

3. Quel est le lien entre la capacité d'altération des minéraux et le génome ?

- 3.1. Article 1 : Draft genome sequence of *Collimonas pratensis* strain PMB3(1), an effective mineral-weathering and chitin-hydrolyzing bacterial strain

L. Picard, P. M. Oger, M. P. Turpault, S. Uroz
Microbiology Resource Announcements (2020)

<https://doi.org/10.1128/MRA.00601-20>

RESUME : Nous annonçons le séquençage du génome de la souche *Collimonas pratensis* PMB3(1), isolée à partir de la mycorrhizosphère de *Scleroderma citrinum* associé au chêne. En plus de sa capacité à altérer les minéraux et de son activité antifongique, cette souche possède des caractéristiques génomiques qui lui confèrent un grand potentiel en tant qu'agent de lutte biologique et promoteur de la croissance des plantes (PGP) dans les sols pauvres en nutriments.

CONTRIBUTION : Dans ce « genome announcement », j'ai participé à l'analyse du génome de la souche modèle PMB3(1) et à la rédaction de l'article.

TITLE: Draft Genome Sequence of *Collimonas pratensis* Strain PMB3(1), an Effective Mineral-Weathering and Chitin-Hydrolyzing Bacterial Strain

Running title: Draft genome of *Collimonas pratensis* strain PMB3(1)

AUTHORS: Picard, L.^{1,2}, Oger, P.M.³, Turpault, M-P.², Uroz, S.^{1,2#}

¹ Université de Lorraine, INRAE, UMR1136 « Interactions Arbres-Microorganismes », F-54280 Champenoux, France

² INRAE, UR1138 « Biogéochimie des écosystèmes forestiers », F-54280 Champenoux, France

³ Univ Lyon, INSA de Lyon, CNRS UMR 5240, Lyon, France

Corresponding author: Mailing address:

Université de Lorraine, INRAE, “Interactions Arbres Microorganismes”, UMR 1136, 54280 Champenoux, France. Phone: +33 (0)3 83 39 40 81, Fax: +33 (0)3 83 39 40 69. E-mail: stephane.uroz@inrae.fr.

ABSTRACT

We announce the draft genome sequence of *Collimonas pratensis* PMB3(1), isolated from the *Scleroderma citrinum* mycorrhizosphere. In addition to its mineral-weathering effectiveness and antifungal activity, this strain is characterized by genomic features that give it great potential as a biocontrol and plant growth-promoting agent in nutrient-poor soils.

ANNOUNCEMENT

In temperate regions, forests develop mostly on nutrient-poor and acidic soils, in which minerals represent essential sources of nutritive cations (Ca, Mg, K, Fe). Cations entrapped in these minerals are made bioavailable to the plants through a dissolution process termed “mineral weathering”, in which bacteria play an essential part (Uroz *et al.*, 2009b). *Collimonas* species are considered very effective mineral-weathering and plant-growth-promoting bacteria (Uroz *et al.*, 2009b; Koele *et al.*, 2009). Representatives of this genus belong to the Oxalobacteraceae family, which comprises four described species (*C. anthrihumi*, *C. arenae*, *C. fungivorans*, and *C. pratensis*) (de Boer *et al.*, 2004; Hoppener-Ogawa *et al.*, 2008; Lee, 2018). Collimonads are members of the rare biosphere found in acidic soils, with low nutrient availability and often in interaction with fungi (Leveau *et al.*, 2010; Doan *et al.*, 2019; Uroz *et al.*, 2007; Calvaruso *et al.*, 2007). Strain PMB3(1) was isolated from oak rhizosphere on 10 % tryptic soy agar (TSA) medium and cryopreserved in 40% glycerol.

Strain PMB3(1) was grown at 25 °C in LB medium to late exponential phase. The cell pellet was lysed with lysozyme (1 mg/ml) at 50 °C for 1 h, sodium dodecyl sulfate (final concentration, 1 %), and proteinase K (final concentration, 1 mg/ml), followed by chloroform purification and ethanol precipitation as described by Pospiech and Neumann (Pospiech and Neumann, 1995). The libraries were prepared using the Kapa HyperPlus kit (Roche) and Nextera XT DNA library preparation kit (Illumina), following the manufacturer’s instructions. A combination of a mate pair library of 3 kb, an unpaired fragment library of 500-bp fragments done on a GS-FLX 454 system (Roche), and an Illumina library of 100-bp reads done on a MiSeq instrument (Beckman Coulter Genomics, Danvers, MA, USA) was effected. A total of 111,000 454 reads and 41 million Illumina reads were generated, providing 309 Mb of 454 reads and 4,153 Mb of Illumina reads.

For all of the following programs, default parameters were used except where otherwise specified.

De novo assembly was performed using MIRA (version 4.0) (Chevreux *et al.*, 1999). The draft genome has 137 contigs larger than 500 bp, which were assembled into 16 scaffolds, with a

calculated total length of 5,613,242 bp (average depth of coverage, 30×), a G+C content of 59%, and an N50 contig size of 380,062 bp. The largest scaffold generated was 1,367,376 bp, and the N50 scaffold size was 559,889 bp. Genome-based taxonomy assigned strain PMB3(1) to the species *Collimonas pratensis* (digital DNA-DNA hybridization [dDDH] value, 84 %; <https://tygs.dsmz.de>). The genome of PMB3(1) comprises a total of 5,136 predicted protein-coding genes and 52 tRNA genes.

According to RAST (Aziz *et al.*, 2008), 12 % of the predicted proteins appeared involved in carbohydrate metabolism, including the Entner-Doudoroff pathway, in which glucose is oxidized to gluconate. The production of gluconate was proposed to play a role in mineral weathering (Babu-Khan *et al.*, 1995). However, no pyrroquinoline quinone (PQQ) system was detected. Based on genome analysis, strain PMB3(1) may produce metabolites with antibacterial (rhizomide and feglymycin) or antifungal (iturin) activities as well as siderophores and organic acids. These activities suggest that PMB3(1) is well equipped to live in the rhizosphere of plants growing in nutrient-poor environments, to inhibit fungal growth, and to mobilize nutrients through its mineral-weathering potential, making it a promising growth-promoting and biocontrol agent (Shinohara and Hirose, 2016; Doan *et al.*, 2019).

Data availability

The whole-genome and raw sequences are available under the accession no. WXXL00000000 and SRX8380211 through SRX8380213, respectively.

ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by grants from the EC2CO program of the CNRS to S.U. and P.O. and the Labex ARBRE (GeMM) project to S.U., L.P. was also supported by a fellowship from the French Ministère de l'Enseignement Supérieur, de la Recherche et de l'Innovation. The UMR 1136 and UR 1138 programs are supported by the ANR through the Laboratory of Excellence Arbre (ANR-11-LABX-0002-01).

We thank C. Calvaruso and P. Frey-Klett for harvesting and isolating the bacterial collection from Breuil-Chenue forest.

REFERENCES

- Aziz, R.K., Bartels, D., Best, A.A., DeJongh, M., Disz, T., Edwards, R.A., et al. (2008) The RAST server: Rapid Annotations using Subsystems Technology. *BMC Genomics* **9**: 1–5.
- Babu-Khan, S., Yeo, T.C., Martin, W.L., Duron, M.R., Rogers, R.D., and Goldstein, A.H. (1995) Cloning of a mineral phosphate-solubilizing gene from *Pseudomonas cepacia*. *Appl Environ Microbiol* **61**: 972–978.
- Calvaruso, C., Turpault, M.-P., Leclerc, E., and Frey-Klett, P. (2007) Impact of ectomycorrhizosphere on the functional diversity of soil bacterial and fungal communities from a forest stand in relation to nutrient mobilization processes. *Microb Ecol* **54**: 567–577.
- Chevreur, B., Wetter, T., Suhai, S. (1999) Genome sequence assembly using trace signals and additional sequence information. *German conference on bioinformatics* **99**: 45–56.
- De Boer, W., Leveau, J.H.J., Kowalchuk, G.A., Gunnewiek, P.J., Abeln, E.C., Figge, F.J., et al. (2004) *Collimonas fungivorans* gen. nov., sp. nov., a chitinolytic soil bacterium with the ability to grow on living fungal hyphae. *Int J Syst Evol Microbiol* **54**: 857–864.
- Doan, H.K., Maharaj, N.N., Kelly, K.N., Miyao, E.M., Davis, R.M., and Leveau, J.H.J. (2020) Antimycotal activity of *Collimonas* isolates and synergy-based biological control of *Fusarium* wilt of tomato. *Phytobiomes J* **4**: 64–74.
- Höppener-Ogawa, S., de Boer, W., Leveau, J.H.J., van Veen, J.A., de Brandt, E., Vanlaere, E., et al. (2008) *Collimonas arenae* sp. nov. and *Collimonas pratensis* sp. nov., isolated from (semi-)natural grassland soils. *Int J Syst Evol Microbiol* **58**: 414–419.
- Koele, N., Turpault, M.-P., Hildebrand, E.E., Uroz, S., and Frey-Klett, P. (2009) Interactions between mycorrhizal fungi and mycorrhizosphere bacteria during mineral weathering: Budget analysis and bacterial quantification. *Soil Biol Biochem* **41**: 1935–1942.
- Lee, S.D. (2018) *Collimonas antrihumi* sp. nov., isolated from a natural cave and emended description of the genus *Collimonas*. *Int J Syst Evol Microbiol* **68**: 2448–2453.
- Leveau, J.H.J., Uroz, S., and de Boer, W. (2010) The bacterial genus *Collimonas* : mycophagy, weathering and other adaptive solutions to life in oligotrophic soil environments. *Environ Microbiol* **12**: 281–292.
- Pospiech, A., Neumann, B. (1995) A versatile quick-prep of genomic DNA from Gram-positive bacteria. *Trends Genet* **11**: 217–218.
- Shinohara, H. and Hirose, Y. (2016) Novel *Collimonas* bacteria and method for controlling harmful plant pathogen using said bacteria. *U.S. Patent Application* **14**: 774,012.

- Uroz, S., Calvaruso, C., Turpault, M.-P., Pierrat, J.C., Mustin, C., and Frey-Klett, P. (2007) Effect of the mycorrhizosphere on the genotypic and metabolic diversity of the bacterial communities involved in mineral weathering in a forest soil. *Appl Environ Microbiol* **73**: 3019–3027.
- Uroz, S., Calvaruso, C., Turpault, M.-P., Sarniguet, A., de Boer, W., Leveau, J.H.J., and Frey-Klett, P. (2009b) Efficient mineral weathering is a distinctive functional trait of the bacterial genus *Collimonas*. *Soil Biol Biochem* **41**: 2178–2186.

3.2. Analyse complémentaire du génome ; y a-t-il des gènes candidats potentiellement impliqués dans l'altération des minéraux ?

Sur la base des mécanismes moléculaires impliqués dans l'altération des minéraux décrits dans l'introduction, j'ai exploité le génome de la souche modèle PMB3(1) en utilisant l'annotation et les outils proposés par la plateforme MAGE pour rechercher des gènes suspectés ou décrits dans d'autres souches pour leur rôle dans l'altération (INTRODUCTION §4).

3.2.1. Quel type de glucose déshydrogénase possède PMB3(1) dans son génome ?

D'après l'annotation par MAGE, le génome de PMB3(1) possède 5 glucose déshydrogénases (GDH) (description dans le Tableau 1.6) :

i) Trois sont des glucose-6P déshydrogénases avec une localisation cytoplasmique et impliquées dans la voie ED ou PP. Elles sont codées par des gènes nommés *zwf* (décrit chez *E coli* (Rowley and Wolf, 1991) et *B. subtilis* (Duan *et al.*, 2010)). L'analyse Pfam sur les séquences protéiques, a permis d'identifier la présence d'un domaine de fixation au NAD, cela est en accord avec la mesure de l'activité de cette enzyme par réduction du NAD (Bao *et al.*, 2015).

ii) Une UDP-glucose 6-déshydrogénase a également été détectée, sa localisation cellulaire est inconnue. Cette enzyme est responsable de la conversion de l'UDP-glucose en UDP-gluconate dans des voies alternatives du glucose. L'UDP-gluconate sert de précurseur pour la production d'acide colanique (Stevenson *et al.*, 1996) ou la synthèse de l'antigène K30 chez *E coli* (Drummelsmith *et al.*, 1997). D'après une analyse Pfam, la séquence protéique présente un domaine de liaison au NAD suggérant l'utilisation de ce cofacteur.

iii) Enfin, une Glucose/Sorbosone déshydrogénase a été identifiée dans le génome de PMB3(1). La plateforme de MAGE indique que cette protéine appartiendrait à la famille des quinoprotéines hydrosolubles ce qui est en accord avec l'analyse BLASTP sur NCBI réalisée sur la séquence protéique qui indique 62.92 % d'identité avec la déshydrogénase PQQ-dépendante [WP_148292926.1] de *Ralstonia solanacearum* et 51.38 % avec celle de *Gluconobacter frateurii* [WP_010500989.1]. Néanmoins l'analyse Pfam ne permet pas d'identifier de domaines de liaison au PQQ.

Tableau 1.6 : Identification de gènes potentiellement impliqués dans l'altération des minéraux par la souche modèle PMB3(1)

n.s. : non significatif

Accession (MAGE)	Gène	Fonction supposée	BLASTP		Localisation cellulaire	Cofacteur	Voie métabolique
			% Id protéine	espèce			
Glucose déshydrogénase							
COLLI_v1_200088	<i>zwf</i>	Glucose-6-phosphate 1-dehydrogenase 1	n.s.	GDH-PQQ	<i>Pseudomonas azotoformans</i>	[AQT92806.1]	cytoplasmique NAD/NADH EMP / PP
COLLI_v1_260043	<i>zwf</i>	NADP(+)-dependent glucose-6-phosphate dehydrogenase	n.s.	GDH-PQQ	<i>Pseudomonas azotoformans</i>	[AQT92806.1]	cytoplasmique NAD/NADH EMP / PP
COLLI_v1_260051	<i>zwf</i>	NADP(+)-dependent glucose-6-phosphate dehydrogenase	n.s.	GDH-PQQ	<i>Pseudomonas azotoformans</i>	[AQT92806.1]	cytoplasmique NAD/NADH EMP / PP
COLLI_v1_690037	<i>udg</i>	UDP-glucose 6-dehydrogenase	n.s.	GDH-PQQ	<i>Pseudomonas azotoformans</i>	[AQT92806.1]	? NAD/NADH biosynthèse de bioliposaccharides ? PQQ ?
COLLI_v1_200359	-	Glucose / Sorbose dehydrogenase family protein	n.s.	GDH-PQQ	<i>Pseudomonas azotoformans</i>	[AQT92806.1]	? PQQ ?
Quinoprotéine							
COLLI_v1_150008		PQQ enzyme repeat family protein	35	PQQ-binding-like beta-propeller repeat protein	<i>Petrotoga sp.</i>	[WP_199172646.1]	? PQQ ?
Phénazines							
COLLI_v1_20114		Phenazine biosynthesis protein PhzF	77	PhzF family phenazine biosynthesis protein	<i>Cupriavidus sp.</i>	[WP_039015514.1]	
COLLI_v1_460079		Phenazine biosynthesis protein PhzF like	77	PhzF family phenazine biosynthesis protein	<i>Mesorhizobium loti</i>	[WP_109665597.1]	
Anhydrase carboniques							
COLLI_v1_180062	<i>cah</i>	Carbonicanhydrase	53	carbonic anhydrase family protein	<i>Variovorax sp.</i>	[WP_088956979.1]	
COLLI_v1_540023	<i>can</i>	Carbonicanhydrase 2	84	carbonate dehydratase	<i>Glaciimonas immobilis</i>	[WP_168053857.1]	
COLLI_v1_670014	<i>cynT</i>	Carbonicanhydrase 1	90	carbonic anhydrase	<i>Acidovorax sp.</i>	[OYX11600.1]	
Sidérophore							
de COLLI_v1_190025		Synthèse d'ornibactine ?					
à COLLI_v1_190038							

D'après l'annotation actuelle du génome, aucune GDH dépendante du cofacteur PQQ n'est donc identifiée. Les enzymes décrites ci-dessus utilisent plutôt le NAD/NADH.

Les différentes GDHs de PMB3(1) ont été alignées avec une GDH-PQQ de la souche de *Pseudomonas azotoformans* dont l'implication dans l'altération des minéraux a récemment été démontrée expérimentalement ([AQT92806.1] ; (Wang *et al.*, 2020)). Il s'avère qu'aucune des 5 protéines décrites ne présentent d'homologie significative.

3.2.2. *Collimonas pratensis* PMB3(1) possède-t-il des gènes de synthèse de PQQ ?

Sur la base de l'annotation MAGE et de BLASTs indépendants, aucun des gènes typiques impliqués dans la synthèse du cofacteur PQQ n'a été détecté. Une seule protéine présente une homologie avec une quinoprotéine dans le génome de PMB3(1) sans compter celle décrite ci-dessus (*i.e.*, glucose/sorbosone déshydrogénase) (Tableau 1.6).

Sachant que toutes les GDHs impliquées dans l'altération des minéraux et décrites jusqu'à présent présentent une activité PQQ-dépendantes, comment la souche PMB3(1) est-elle capable d'altérer les minéraux sans ce cofacteur ?

3.2.3. Peut-on identifier sur la base de l'annotation du génome les gènes impliqués dans la synthèse de sidérophore ?

D'après une analyse AntiSMASH (disponible directement sur MAGE), un cluster de gènes a été identifié comprenant deux gènes codant des NRPS (région décrite dans le CHAPITRE 3). Ce cluster de gènes est similaire au cluster de gènes identifié *in silico* pour les souches de *Collimonas* Ter331, Ter6, Ter91, Ter291, Ter10, Ter282 (Song *et al.*, 2015). Les prédictions réalisées par AntiSMASH proposent que ce cluster soit responsable de la synthèse d'ornibactine comme le propose également Song *et al.* sur la base d'analyses bioinformatiques. L'implication d'un tel sidérophore dans l'altération des minéraux n'a cependant jamais été démontrée.

3.2.4. D'autres gènes présents dans le génome de PMB3(1) pourraient-ils être impliqués dans l'altération des minéraux ?

Deux gènes de synthèse de phénazines (*phzF*) ont été identifiés sur la base de l'annotation du génome par MAGE. Sachant que la synthèse de phénazine nécessite un cluster de plusieurs gènes, la seule présence du gène *phzF* ne permet pas à la souche PMB3(1) de synthétiser des phénazines (Mavrodi *et al.*, 1998). Une recherche plus approfondie serait nécessaire pour conclure sur la possible synthèse de ce type de molécules par la souche PMB3(1) (BLAST...).

Comme décrit dans l'introduction, dans certaines conditions particulières (faible pCO₂, et faible concentration en calcium), les anhydrases carboniques pourraient potentiellement être impliqués dans l'altération des minéraux. Trois gènes codant des anhydrases carboniques ont été identifiés dans le génome de la souche PMB3(1). Néanmoins, aucun mutant n'a été généré pour démontrer l'implication réelle de ces gènes dans l'altération des minéraux.

Ces pistes n'ont pas été poursuivies durant mes travaux de thèse.

4. Conclusion

L'analyse du génome de la souche PMB3(1) sur la base des annotations RAST et MAGE n'a pas clairement permis d'identifier de gène codant pour une glucose déshydrogénase PQQ-dépendante. Aucun gène de synthèse de PQQ n'a été identifié. Par contre, un cluster de gènes potentiellement impliqué dans la synthèse de sidérophores a été identifié dans le génome de la souche PMB3(1).

Ces premières observations amènent à deux questions :

i) Etant donné que la littérature suggère que le cofacteur PQQ et la GDH-PQQ représentent les mécanismes majeurs de l'altération par acidolyse, qu'en est-il des bactéries (dont la souche PMB3(1)) qui ne possèdent pas ce cofacteur ?

Pour répondre à cette question, une approche sans *a priori* de mutagenèse aléatoire a été réalisée sur la souche PMB3(1) suivie d'un criblage fonctionnel pour identifier des mutants affectés dans la capacité à altérer les minéraux (CHAPITRE 2).

ii) Les prédictions bioinformatiques indiquent que le sidérophore produit par la souche PMB3(1) serait de l'ornibactine, mais aucune validation chimique n'a été réalisée et le rôle dans

l'altération reste à déterminer. Pour élucider ces deux derniers points, une approche avec *a priori* de mutagenèse ciblée a été réalisée sur la souche modèle PMB3(1) (CHAPITRE 3).

CHAPITRE 2

La Glucose/Méthanol/Choline oxydoréductase, une enzyme impliquée dans l'altération des minéraux *via* un processus d'acidolyse

1. Préambule

L'analyse du génome de la souche modèle *Collimonas pratensis* PMB3(1) nous a permis de découvrir que cette souche altérante ne possédait pas de système PQQ ni de quinoprotéines. Sachant que le mécanisme moléculaire de l'altération des minéraux le plus décrit est lié à une glucose déshydrogénase PQQ-dépendante (GDH-PQQ), quels mécanismes PQQ-indépendants ont été développés par la souche modèle pour altérer les minéraux ? Ce questionnement a été adressé à travers une approche sans *a priori* de mutagenèse aléatoire.

2. **Article 2 : Identification of a novel type of glucose dehydrogenase involved in the mineral weathering ability of *Collimonas pratensis* strain PMB3(1)**

L. Picard, M. P. Turpault, P. M. Oger, S. Uroz

FEMS Microbiology Ecology (2021)

<https://doi.org/10.1093/femsec/fiaa232>

RESUME : Les mécanismes moléculaires exacts ainsi que les gènes impliqués dans l'altération des minéraux par les bactéries restent peu connus. Au jour d'aujourd'hui, un seul type de glucose déshydrogénase (GDH) dépendante d'un cofacteur particulier appelé pyrroloquinoline quinone (PQQ) a été découvert. Cette enzyme permet la production d'acide gluconique par la voie d'oxydation directe du glucose. Cependant, il existe des bactéries altérantes qui ne possèdent pas de GDH-PQQ dépendantes ni même les gènes de synthèse du système PQQ dans leur génome. Il reste donc encore à déterminer comment ces bactéries sont capables d'altérer les minéraux. Dans cette étude, nous avons considéré la souche bactérienne *Collimonas pratensis* PMB3(1) particulièrement efficace à altérer les minéraux. L'analyse de son génome a révélé que cette souche ne possédait pas de système PQQ. Les techniques de mutagenèse aléatoire, complémentation de gènes et tests fonctionnels nous ont permis d'identifier des mutants impactés dans leur capacité à altérer les minéraux. Parmi eux, trois mutants étaient fortement atteints dans leur capacité d'acidification et d'altération de la biotite (de 58 à 75 % de réduction comparé à la souche sauvage), ils ne produisaient pas non plus d'acide gluconique. La caractérisation de la région génomique nous a permis notamment d'identifier une Glucose/Méthanol/Choline oxydoréductase. Cette région apparaît très conservée au sein du genre *Collimonas* et des genres proches. Cette étude représente la première démonstration de

l'implication d'une GDH PQQ indépendante dans le processus d'altération des minéraux et explique comment les *Collimonas* altèrent les minéraux.

Mots clés : *Collimonas pratensis* PMB3(1) ; altération des minéraux ; glucose/méthanol/choline oxydoréductase ; glucose déshydrogénase PQQ-indépendante ; biotite

CONTRIBUTION : Dans cet article, j'ai participé au design expérimental, réalisé les expérimentations, l'analyse des résultats et la rédaction de l'article.

TITLE: Identification of a novel type of glucose dehydrogenase involved in the mineral weathering ability of *Collimonas pratensis* strain PMB3(1)

Running title: Mineral weathering by a glucose dehydrogenase

AUTHORS: Picard, L.^{1,2}, Turpault, M-P.², Oger, P.M.³, Uroz, S.^{1,2#}

¹ Université de Lorraine, INRAE, UMR1136 « Interactions Arbres-Microorganismes », F-54280 Champenoux, France

² INRAE, UR1138 « Biogéochimie des écosystèmes forestiers », F-54280 Champenoux, France

³ Univ Lyon, INSA de Lyon, CNRS UMR 5240, Lyon, France

Corresponding author: Mailing address:

Université de Lorraine, INRAE, “Interactions Arbres Microorganismes”, UMR 1136, 54280 Champenoux, France. Phone: +33 (0)3 83 39 40 81, Fax: +33 (0)3 83 39 40 69. E-mail: stephane.uroz@inrae.fr.

Key words: *Collimonas pratensis* PMB3(1), mineral weathering, Glucose/Methanol/Choline oxidoreductase, PQQ-independent glucose dehydrogenase, biotite

ABSTRACT

The exact molecular mechanisms as well as the genes involved in the mineral weathering (MW) process by bacteria remain poorly characterized. To date, a single type of glucose dehydrogenase (GDH) depending on a particular co-factor named pyrroloquinoline quinone (PQQ) is known. These enzymes allow the production of gluconic acid through the oxidation of glucose. However, it remains to be determined how bacteria missing PQQ-dependent GDH and/or the related *pqq* biogenesis genes weather minerals. In this study, we considered the very effective mineral weathering bacterial strain PMB3(1) of *Collimonas pratensis*. Genome analysis revealed that it does not possess the PQQ based system. The use of random mutagenesis, gene complementation and functional assays allowed us to identify mutants impacted in their ability to weather mineral. Among them, three mutants were strongly altered on their acidification and biotite weathering abilities (58 to 75% of reduction compared to WT) and did not produce gluconic acid. The characterization of the genomic regions allowed noticeably to the identification of a Glucose/Methanol/Choline oxidoreductase. This region appeared very conserved among collimonads and related genera. This study represents the first demonstration of the implication of a PQQ-independent GDH in the mineral weathering process and explains how *Collimonas* weather minerals.

INTRODUCTION

Minerals represent physical supports and reservoirs of nutritive elements for the development of the biosphere. Their dissolution, *i.e.*, mineral weathering (MW), participates in the release of their nutritive constituents. This essential process permits to maintain the relative fertility of the soils and to support the growth of the plants. In nutrient-poor and non-amended environments such as forests, minerals are considered as one of the most important stock of nutrients for the long-lasting development of the ecosystem (Ranger and Turpault, 1999). However, MW is a slow process, which depends on the intrinsic properties of those minerals (*i.e.*, dissolution constant) and extrinsic conditions that result from a combination of abiotic and biotic processes. For instance, in acidic draining medium, biotite dissolves faster than quartz because of their intrinsic properties (*i.e.*, chemical composition) (Brantley, 2008). In drained soils, water and acid circulation are known as important abiotic factors involved in the dissolution of minerals. Plants and soil microorganisms are also known to participate in this process (Gadd, 2007; Landeweert *et al.* 2001). Tree roots and fungal hyphae can physically weather minerals (*i.e.*, division) through the pressure applied (Bonneville *et al.* 2009). Plant development through nutrient pumping and rhizosphere acidification induces stronger MW than in the surrounding bulk soil (Calvaruso *et al.* 2009; Turpault *et al.* 2009; Hinsinger *et al.* 2003). The production of chelating and acidifying agents was also reported for a wide range of plants, symbiotic fungi and bacteria (Jongmans *et al.* 1997; Uroz *et al.* 2009a).

Effective MW bacteria have been described in various environments, and especially in the rhizosphere of different plants (*i.e.*, trees, cactus) living in nutrient-poor environments (Puente *et al.* 2004). Notably, several studies evidenced a significant enrichment of these functional communities in the rhizosphere compared to the surrounding bulk soil (Collignon *et al.* 2011; Calvaruso *et al.* 2010; Zhang *et al.* 2016). In addition, microcosm experiments revealed that effective MW bacterial strains can improve plant growth. Indeed, the inoculation or co-inoculation of different MW bacterial strains was shown to increase the seedling biomass, the shoot length, the root biomass, the total root length and the total root surface area of *Pinus sylvestris* compared to non-inoculated plants (Calvaruso *et al.* 2006; Koele *et al.* 2009). To date, the ability to solubilize mineral has been reported for a wide range of bacterial genera (*i.e.*, *Achromobacter*, *Agrobacterium*, *Bacillus*, *Collimonas*, *Pseudomonas*, *Rhizobium*, *Burkholderia*, *Micrococcus*, *Aereobacter*, *Flavobacterium* or *Erwinia*) (Puente *et al.* 2004; , Collignon *et al.* 2011; Rodriguez and Fraga, 1999; Uroz *et al.* 2011).

If the ability of the bacteria to weather minerals is well documented, our understanding of the molecular basis and especially of the genes involved in MW remains limited. This gap of

knowledge has seriously hampered studies of the ecology, evolution and relative role of the mineral weathering bacteria. To date, no molecular tools exist to assess and quantify the occurrence, diversity, and activity of mineral weathering genes in natural bacterial populations. Heterotrophic bacteria are known to produce chelating agents (*i.e.*, siderophores and organic acids) and acidifying metabolites (*i.e.*, protons, organic acids), but the molecular demonstrations of their relative role in the MW process are limited as well as is our knowledge of the conservation among bacteria of the molecular markers involved. Considering the organic acid production, several studies showed that the direct oxidation pathway of glucose is involved and more specifically the steps producing gluconic acid (GA) and 2-ketogluconic acid (2KGA) through the activity of a glucose dehydrogenase (GDH) and a gluconate dehydrogenase (GADH), respectively (Goldstein, 1995). To date, the demonstration of the link between phosphate dissolution and the activity of the GDH activity was obtained on a wide range of bacterial genera. All these studies highlighted the implication of a specific type of GDH that depends on a particular cofactor, the pyrroloquinoline quinone (PQQ) (Goldstein *et al.* 2003; Babu-Khan *et al.* 1995; Liu *et al.* 1992; Wagh *et al.* 2014). The implication of a PQQ-dependent GDH enzyme in the dissolution of a complex mineral, biotite, was recently evidenced for a strain of *Pseudomonas* (Wang *et al.* 2020).

In this study, we investigated the molecular basis of MW in the model bacterial strain *Collimonas pratensis* PMB3(1), which was shown to be very effective at MW (Uroz *et al.* 2007; Uroz *et al.* 2009a). This bacterial genus is usually considered as member of the rare biosphere due to its low representativeness in metagenomic data from soil (Leveau *et al.* 2010). However, collimonads can represent dominant taxa in specific habitats such as on mineral particles or in the mycorrhizosphere (Lepleux *et al.* 2012; Uroz *et al.* 2012, Colin *et al.* 2017). Collimonads are recognized as particularly effective at mobilizing nutrients from recalcitrant sources such as chitin and minerals, suggesting that they are particularly well adapted to live in nutrient-poor conditions (Leveau *et al.* 2010). Their strong MW effectiveness was suggested to be linked to their ability to acidify the medium in presence of glucose and to produce high amounts of gluconic acid (Uroz *et al.* 2009b). Using a random mutagenesis approach, associated to a functional screening and a gene complementation and chemical analyses, we identified the genes involved in the MW ability of strain PMB3(1) and evidenced a novel MW pathway involving a PQQ-independent, synthesis of gluconic acid, encoded by a glucose dehydrogenase (GDH).

Table 1: List of bacterial strains, constructions and primers used in this study

Strains, plasmids or primers	Characteristics	References
Strains		
<i>Collimonas pratensis</i>		
Strain PMB3(1)	Wild type strain	Uroz <i>et al.</i> , 2007
25(10F)	Tet ^R , gdhC::pOT182 disruptant	This study
31(11B)	Tet ^R , resB::pOT182 disruptant	This study
34(11H)	Tet ^R , tat::pOT182 disruptant	This study
25(10F)(pB2-gdhC)	Tet ^R , Km ^R , gdhC complementation	This study
31(11B)(pB2-resB)	Tet ^R , Km ^R , resB complementation	This study
34(11H)(pB2-tatABC)	Tet ^R , Km ^R , tat complementation	This study
WT(pB2)	Wild type strain, Km ^R with empty cloning vector pBBR1MCS2	This study
<i>Escherichia coli</i>		
DH5 α	supE44 Δ lacU169 (Φ 80lacZ Δ M15) recA1 endA1 hsdR17 thi-1 gyrA96 relA1	Lab collection
S17.1 λ pir	TpR Sm ^R recA thi pro hsdRM ⁺ integrated RP4: 2-Tc:Mu: Km Tn7 λ pir	Lab collection
Plasmids		
pOT182	from pSUP102 (Gm ^R) containing Tn5-OT182 (Tet ^R)	Dennis and Zylstra, 1998
pBBR1MCS2	Km ^R ; Broad spectrum cloning vector	Kovach <i>et al.</i> , 1995
Primers		
		Tm (°C)
pOT-RT (sequencing)	5'-ACATGGAAGTCAGATCCTGG-3'	
pOT-For	5'-ATGGATCCCGTCGTTTTACAAC-3'	56
pOT-Rev	5'-GACATCGCAGGCTTCTGCTT-3'	56
gdhC-For-KpnI	5'-GAGGACggtaccATGACGGCC-3'	62
gdhC-Rev-SpeI	5'-TGCGAAACactagtCTTACTGCTTG-3'	62
resB-For-SpeI	5'-CAAactagtTATGAGCACAAGCAAC-3'	59
resB-Rev-SacI	5'-TGCGCAGagctcCACTAGACTTT-3'	59
tatABC-For-SmaI	5'-TTAGCAGGccccgggCACAAAGAT-3'	62
tatABC-Rev-XbaI	5'-TTGAGCCAATGCtctagaAGGGTG-3'	62

MATERIALS AND METHODS

Bacterial strains and growth media

Bacterial strains and plasmids are listed in Table 1. The model bacterial strain *Collimonas pratensis* PMB3(1) considered in this study was isolated from oak (*Quercus petraea*)–*Scleroderma citrinum* ectomycorrhizae sampled in the organo-mineral soil horizon from the long term experimental forest site of Breuil-Chenue located in the Morvan region (France; for sampling details see Calvaruso et al. 2007). Strain PMB3(1) was isolated from the symbiotic fungal mantle of the mycorrhizal fungus. Previous experiments showed that the strain PMB3(1) was particularly effective at weathering mineral (Uroz et al. 2007, 2009b). All strains were grown at 25°C, except the strains of *Escherichia coli*, which were grown at 37°C. The media used were Luria-Bertani (LB), AB medium (Chilton et al. 1974) and a modified version of the Bushnell-Haas (BHM; devoid of iron) medium (Uroz et al. 2007). The AB minimal (ABm) medium was supplemented with mannitol (2 g/l final concentration) as carbon source. The BHM medium was supplemented with glucose (2 g/l final concentration) as carbon source. Glucose was selected in our experiments because it represents the dominant carbohydrate source found in forest soil and in plant root exudates (Jolivet et al. 2006; Medeiros et al. 2006; Grayston and Campbell, 1996). Its presence is also explained by hydrolysis of various compounds such as starch, saccharose (Derrien et al. 2004) or by hydrolysis of trehalose, a carbohydrate accumulated in mycorrhizal roots (Martin et al. 1985). Antibiotics, when required, were added to the media at the following final concentrations: Tetracycline 10 µg/ml, Kanamycin 100 µg/ml and Ampicillin 100 µg/ml.

Tn5-OT182 mutagenesis

The wild-type strain PMB3(1) of *C. pratensis* was mutagenized with Tn5-OT182 as described previously (Deshazer et al. 1997; Dennis et al. 1998), with minor modifications. The donor strain, *E. coli* S17-1λpir (pOT182), was grown at 37°C in antibiotic-containing LB broth overnight, and the recipient strain, *C. pratensis* PMB3(1), was grown at 25°C in ABm liquid medium for 2 days. The day of the bi-parental conjugation, each culture (30 ml) was centrifuged and washed twice with sterile MQ water to remove any antibiotic from the medium and mixed in a final volume of 5 ml of sterile MQ water. The mixed suspension was spotted on agar LB plates (*i.e.*, 10 µl drops). After 5h of incubation at 25°C, the bacterial lawn of each plate was harvested using sterile MQ water (5 ml), and 150 µl of this suspension were plated on tetracycline-containing ABm plates for isolation of the Tn5 mutants of the strain PMB3(1). A total of 2,000 mutants able to grow on ABm supplemented with mannitol and tetracycline were

recovered after 5 days incubation at 25°C and organized in 96-well microplates. To confirm the presence of the plasposon in the mutant genome, a portion of the plasposon sequence was amplified by PCR using pOT-For and pOT-Rev primers (Table 1). The quality of the mutant library was tested on a subset of Tn5 mutants and on the mutants of interest to determine whether the library was formed by independent events.

DNA manipulations and plasposon rescue

Total DNA was extracted from the WT strain PMB3(1) and the related Tn5 mutants using the protocol of Pospiech and Neumann (1995). The flanking Tn5-OT182 integration regions were identified using the rescue method as described previously (Deshazer et al. 1997). Briefly, 5 µg of DNA of each mutant was digested 4 h with *EcoRI*-HF in 50 µl. After heat inactivation, the digested DNA was ligated overnight in 25 µl. A volume of 10 µl was transformed into chemically competent *E. coli* DH5α and the transformants recovered on the appropriate selective medium. The resulting plasmids were extracted using the Miniprep kit from QIAGEN and sequenced with the primer pOT-RT at Eurofins MWG Operon (<https://www.eurofinsgenomics.eu/>). All enzymes for restriction digestion and ligation were purchased from New England Biolabs and were used according to the manufacturers' instructions. When required, PCR amplicons were purified using QIAquick PCR purification and gel extraction kits from QIAGEN. PCR was performed using Taq polymerase from 5PRIME.

Construction of pB2-gdhC, pB2-resB and pB2-tatABC

The ineffective MW phenotype of three Tn5-OT182 mutants of the strain PMB3(1) were complemented by expressing each gene or region of interest (*gdhC*, *resB* and *tatABC*) in trans on plasmids pB2-*gdhC*, pB2-*resB* and pB2-*tatABC*. These genes/regions were amplified using specific primers (Table 1). The conditions for PCR involved a 5min denaturation step at 94°C, followed by 30 cycles of 94°C for 45s, melting temperature (T_m) for 45s, and 72°C for 2min30s. The T_m temperature was adapted according to the gene or region of interest. Each PCR product was purified and ligated into the pGEM-T Easy plasmid (Promega), and validated by Sanger sequencing (52). The gene *gdhC* was cloned as a *KpnI* - *SpeI* fragment, the gene *resB* as a *SacI* - *SpeI* fragment, and the *tatABC* genes as a *SmaI* - *XbaI* fragment into pBBR1MCS-2 (Kovach *et al.* 1995) to yield plasmids pB2-*gdhC*, pB2-*resB* and pB2-*tatABC* respectively. After verification by sequencing, the resulting constructs were transferred in chemically competent *E. coli* S17-1λpir and conjugated to the corresponding Tn5-OT182 mutant. The

complemented mutants were selected on agar ABm medium supplemented with tetracycline and kanamycin. The presence of the intact gene in the complemented mutants was verified by a PCR using the appropriate primers (Table 1), the WT strain was the positive control and the mutant was the negative control. For each construction, a single transconjugant was conserved after validation and used in the different bioassays described below.

Analysis and quantification of organic acids

After a 4-day culture (25°C; 200 rpm) in liquid BHM amended with glucose (2 g/l) and devoid of iron, the supernatants of cultures of the WT and Tn5-OT182 mutants were recovered by centrifugation (10,000g during 15min). The supernatants were then filtered at 0.22 µm (GHP Acrodisc 25 mm syringe filter ; PALL) and stored at -20°C. Organic acid analyses were performed on an ion chromatography with conductivity detection (ICS 3000, Dionex Corp.) associated to an analytical column (IonPac® AS 11 HC, Dionex corp.) according to Balland *et al.* (2010). The supernatants were eluted with KOH solutions of varying concentrations (0.9-60 mM) over time (step gradient) with a flow rate of 1.3 ml/min. Synthetic organic acids have used as references (sodium formate, D-gluconic acid, sodium butyrate, pyruvic acid sodium salt, sodium citrate tribasic, sodium oxalate, sodium propionate, sodium acetate, succinic acid disodium salt, DL-malic acid disodium salt, sodium-L-lactate and malonic acid disodium salt).

Analysis of the production of gluconate, 2KGA and 5KGA

Qualitative analysis was performed using thin layer chromatography (TLC) to identify which form of gluconic acid was produced by the WT strain PMB3(1). To do it, cultures were done in ABm medium supplemented with 10 g/l of glucose at 25°C and under shaking. After 4 days, the supernatant of culture was recovered and filtered at 0.22 µm (GHP Acrodisc 25 mm syringe filter; PALL). A volume of 4 µl for the standards and twice 4 µl for the culture supernatants were spotted on a Silica Gel 60 plate (Merck). After drying at room temperature, migration was performed in a solvent reagent containing ethyl acetate-acetic acid-methanol and deionized water (6:1.5:1.5:1). When the TLC plate was dried, spread with a freshly prepared revelation solution (diphenylamine (1 g) ; aniline (1 ml) ; acetone (50 ml) ; phosphoric acid (7.5 ml)). The treated TLC plate was then incubated at 120°C for 20 min to allow apparition of coloured spots. The results were analysed by measuring the retention factor (Rf) (corresponding to the distance moved by the sample divided to the solvent front) and the observation of the spot colour. The glucose, gluconate, 2KGA and 5KGA appeared as dark blue, pink, brown and dark purple spots, respectively. Solutions of glucose, gluconate, 2-keto gluconate and 5-keto gluconate adjusted

at 100 mM were used as standard. In addition, gluconic acid was also quantified using an enzymatic bioassay (kit 10428191035 from r-biopharm/Roche), according to the manufacturer's instructions.

Screening of the Tn5-pOT182 mutant library

A first screening of the mutant library was done in microplates using liquid ABm medium supplemented with tetracycline. After 3-days culture, part of the cell suspension was spotted using a 96-well replicator on : i) solid TriCalcium Phosphate (TCP) to determine the MW ability of each Tn5-mutant and ii) modified liquid TCP medium (TCPm) to determine their acidification ability. These two bioassays are commonly used to determine the mineral weathering potential of bacterial strains (Calvaruso *et al.* 2007; Lepleux *et al.* 2013; Uroz *et al.* 2009b; Colin *et al.* 2017). In addition, the homogeneity of the $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ in the TCP assays allow for a high throughput screening of mutant libraries. On the contrary, biotite is a heterogeneous material requiring important replication of the assay, making its use incompatible with a first screening of the mutant libraries. The solid TCP medium is composed per liter of : NH_4Cl 5 g ; NaCl 1 g ; MgSO_4 1 g ; Glucose 10 g ; $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ 4 g and 16 g of agar (pH 6.5). After incubation at 25°C for 7 days, the diameters of colonies and the diameter of discoloration zone (halo) were measured to determine the ability of each Tn5-mutant to solubilize inorganic phosphorous. The TCPm medium is modified version of the TCP devoid of $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$. The $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ was removed from the medium to allow a better determination of the protons produced. The pH determination was performed after a 3-day incubation time. The supernatant was recovered by centrifugation (8,000 g for 15 min) and a volume of 180 μl was transferred to new microplates containing 20 μl of pH indicator (bromocresol green solution ; 1g/l), according to Uroz *et al.* (2007). The pH of the supernatant was determined at 595 nm using an automatic microplate reader (Bio-Rad, model iMark) and converted in pH values using a calibration curve (Uroz *et al.* 2007).

Functional assays done on Tn5-OT182 mutants impaired in their MW ability

After the first step of screening, all the Tn5-OT182 mutants presenting a significantly reduced halo of solubilisation on solid TCP and/or a pH value significantly higher than the WT strain were tested in a calibrated way on different bioassays in order to generate quantitative and comparable data. The recovered Tn5-mutants were cultivated overnight in liquid LBm medium supplemented with tetracycline. The WT strain was used as a positive control. Ten milliliters

of each culture was washed three times with sterile MQ-water to eliminate all medium traces. The absorbance at 595 nm of each resulting suspension was then adjusted at 0.95 ± 0.03 .

Phosphate solubilisation and solution acidification

Ten microliters of each calibrated suspension were then dropped in triplicates on the surface of the solid TriCalcium Phosphate (TCP) and in microplates containing the modified liquid TCP medium (TCPm). Measures of P solubilisation and of acidification were performed as described above (Colin *et al.* 2017).

Biotite dissolution

Five hundred microliters of the calibrated suspension of each strain was transferred into sterile glass tubes containing 4.5 ml of BHm medium (20 mg/l KCl; 150 mg/l $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 80 mg/l $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$; 90 mg/l $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$; 65 mg/l $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 100 mg/l KNO_3 ; 20 mg/l CaCl_2) buffered at pH 6.5 and supplemented with glucose (2 g/l) and 100 mg of sterile biotite particles.

The biotite was obtained from Bancroft (Canada) and is a 2:1 phyllosilicate frequently found in acidic forest soils. This mineral holds K, Mg, and Fe nutrients. It is a pure homogeneous mineral, and its composition is as follows: 410.1 g/kg SiO_2 , 109 g/kg Al_2O_3 , 22.1 g/kg Fe_2O_3 , 100.5 g/kg FeO , 2.7 g/kg MnO , 189 g/kg MgO , 4.1 g/kg Na_2O , 94.6 g/kg K_2O , 22.8 g/kg TiO_2 , 44.2 g/kg F, and 0.8 g/kg Zn. Its structural formula is $(\text{Si}_3\text{Al}_1) (\text{Fe}^{3+}_{0.12} \text{Fe}^{2+}_{0.61} \text{Mg}_{2.06} \text{Mn}_{0.02} \text{Ti}_{0.13})$ and $\text{K}_{0.88} \text{Na}_{0.06} \text{O}_{10} (\text{OH}_{0.98} \text{F}_{1.02})$. The particle size of biotite was calibrated from 200 to 500 μm .

Before use, all glass was rinsed with chloridric acid and deionised water to remove any chemical traces. The tubes containing the culture medium with biotite were then sterilised by autoclaving at 121°C. After seven days of incubation at 25°C (200 rpm), 1 ml of supernatant was sampled and centrifuged at 11,000g for 15 min and filtered at 0.22 μm . Quantification of the iron released from biotite and of the acidification of the medium were determined by adding 180 μl of supernatant of each culture in a new microplate containing 20 μl of ferrospectral or bromocresol green, respectively (Uroz *et al.* 2007). The absorbance of these suspensions was measured at 595 nm and the data transformed in pH and iron concentrations using the colorimetric assays described above to determine the MW potential of each Tn5-pOT182 mutant.

In addition, model chelating (citric acid) or acidifying (hydrochloric acid) molecules were used as control in the same mineral weathering assay. Serial dilutions of citric acid (10^{-3} M; pH

adjusted to 6 to 2) and hydrochloric acid (concentration adjusted to be at pH 6 to 2) were performed in BHm medium and incubated in the same condition than the bacterial strains tested as described in Uroz *et al.* 2007.

Cytochrome oxydase test

To test if mutants are affected in their cytochrome oxydase activity, 100 µl of the calibrated cell suspension were spotted on a filter paper and flooded in a 1% Tetramethyl-p-phenylenediamine (TMPD) solution during 10 min. After this incubation period, the filter paper was dried 30s and inspected. In the case of a positive reaction, the filter paper becomes purple, while in the case of a negative reaction it remains white (Kovacs, 1956).

Glucose dehydrogenase (GDH) test

To test if mutants were affected in their GDH activity, the test of Matsushita and Ameyama (1982) was used on the calibrated cell suspension (CS) or on cell crude extract (CE). The cell crude extract was obtained by ultra sonication treatment (Vibra-Cell; Sonics, Newtown USA) of the CS, followed by a centrifugation at 7000 g (15 min) to remove intact cells and a filtration at 0.22µm. A volume of 100µl of CS or CE was incubated with 100 µl of Tris-HCL (50mM; pH:7.5), 10 µl of 2,6-dichlorophenolindophenol (DCIP; 6.7mM), 10 µl of phenazine methosulfate (PMS; 20mM), 10 µl of (FAD; 600µM), 100µl of glucose (1M), and MQ water in a final volume of 300 µL. The reaction is initiated by the addition of D-glucose. GDH activity is measured at 600 nm in microplate reader (Tecan infinite M200 pro). Controls without glucose and/or FAD were performed. In addition, a control without the CS or CE was performed for each of the condition tested (+/- FAD; +/- Glucose).

Growth assay and carbon substrate use

To determine whether the mutants were impaired in their growth ability, tests were performed under nutrient-rich and nutrient-poor conditions. For the nutrient-rich condition, 10 µl of each calibrated suspension (WT and mutants) were added to 190 µl of liquid LB medium in a microplate. The microplate was incubated at 25°C and orbital shaking during 4 days in a microplate reader (Tecan infinite M200 pro). The absorbance was measured at □□□ nm each 3 hour. For the nutrient-poor condition, 10 µl of each calibrated suspension was added to 190 µl of liquid BHm medium amended with a source of carbon (2 g/l). The carbon sources used were glucose, gluconic acid, 2-Keto-gluconate, 5-Keto-gluconate. After 5 days of incubation at

Table 2: Functional abilities of the PMB31 strain and its mutants 25(10F), 31(11B), 34(11H) and complemented mutants. All numeric values are the mean of at least triplicates and the standard deviation (sd) is presented between brackets. The values obtained for the mutants differing significantly (P -value < 0.05) with the wild-type strain (WT) are indicated with different letters (a, b, c). ⁱ Organic acid quantification was done with ionic chromatography. ⁱⁱ Due to the chromatography method used, gluconate can not be differentiated from 2KGA. ⁱⁱⁱ The presence of gluconate, 2KGA and 5KGA was determined using a TLC approach. For the qualitative data, the symbol - and + mean non-detected and detected, respectively. nt: not tested.

Test/Bacterial strain	WT	25(10F)	31(11B)	34(11H)	25(10F) (pB2-gdhC)	31(11B) (pB2-resB)	34(11H) (pB2-tatABC)
Solubilisation and pH assays							
Halo diameter on TCP (cm)	0.79 (0.04) ^a	0.00 (0.00) ^c	0.00 (0.00) ^c	0.00 (0.00) ^c	0.74 (0.04) ^a	0.62 (0.04) ^b	0.73 (0.04) ^a
Colony diameter on TCP (cm)	0.46 (0.03)	0.49 (0.02)	0.48 (0.02)	0.48 (0.02)	0.44 (0.02)	0.44 (0.02)	0.45 (0.02)
R halo/colony diameter	1.7 ^a	≤1 ^b	≤1 ^b	≤1 ^b	1.7 ^a	1.4 ^a	1.6 ^a
pH (TCP)	4.0 (0.033) ^a	5.0 (0.034) ^c	5.1 (0.03) ^c	5.1 (0.039) ^c	4.4 (0.02) ^b	4.4 (0.03) ^b	4.6 (0.04) ^b
Physiological assays							
Growth rate (h ⁻¹)	0.09 (0.02) ^a	0.09 (0.01) ^a	0.06 (0.01) ^b	0.02 (0.01) ^b	0.10 (0.01)	0.10 (0.01)	0.10 (0.01)
Cytochrome oxidase	+	+	+	+	nt	nt	nt
Organic acid detection and quantificationⁱ							
Gluconate ⁱⁱ (mg/l)	878.67 (5.50) ^a	0.00 (0.00) ^b	0.00 (0.00) ^b	0.00 (0.00) ^b			
Lactate (mg/l)	0.00 (0.00)	0.03 (0.06)	0.00 (0.00)	0.00 (0.00)			
Acetate (mg/l)	0.00 (0.00)	0.00 (0.00)	0.00 (0.00)	0.00 (0.00)			
Propionate (mg/l)	0.00 (0.00)	0.00 (0.00)	0.00 (0.00)	0.00 (0.00)			
Formate (mg/l)	0.20 (0.11)	0.20 (0.17)	0.13 (0.06)	0.23 (0.09)			
Butyrate (mg/l)	0.00 (0.00)	0.00 (0.00)	0.00 (0.00)	0.00 (0.00)			
Pyruvate (mg/l)	2.87 (0.63) ^a	1.08 (0.03) ^b	1.55 (0.23) ^b	0.11(0.06) ^c			
Succinate (mg/l)	0.09 (0.01)	0.07 (0.02)	0.08 (0.01)	0.08 (0.00)			
Maleate (mg/l)	0.00 (0.00)	0.00 (0.00)	0.00 (0.00)	0.00 (0.00)			
Oxalate (mg/l)	0.74 (0.19)	0.91 (0.24)	0.70 (0.09)	0.85 (0.07)			
Fumarate (mg/l)	0.00 (0.00)	0.00 (0.00)	0.00 (0.00)	0.00 (0.00)			
Citrate (mg/l)	0.00 (0.00)	0.00 (0.00)	0.00 (0.00)	0.00 (0.00)			
Gluconate ⁱⁱⁱ	+	-	-	-			
2KGA ⁱⁱⁱ	+	-	-	-			
5KGA ⁱⁱⁱ	-	-	-	-			

25°C, the pH was measured with bromocresol green as described above and the growth was measured at 595 nm.

Bioinformatic analyses

Genome analysis was performed using NCBI and MAGE (Vallenet *et al.* 2009). Homology search analysis and alignment were performed with BLAST (BlastN and BlastP ; Altschul *et al.* 1997). Localization of the Tn5-OT182 insertion was done on MAGE. A research of Twin Arginine Translocation (TAT) signal carrying proteins was done using the predictor servers Tatfind (Dilks *et al.* 2003) and TatP 1.0 (Bendtsen *et al.* 2005). The two proteins lists were assembled and analysed. Analyses of the pfam domains and of the conservation of the GdhL subunit sequence were done using pfam (El-Gebali *et al.* 2019) and Seaview (version 4.5.4) (Gouy *et al.* 2010). To study the conservation of the GdhL sequence, a set of 22 different genera or species related to *Collimonas* and available on international databases were analysed among them, 11 were assigned to *Collimonas* genus (*Collimonas* sp. PA-H2, OK242, OK307 and OK607, *C. fungivorans* Ter331 and Ter6, *C. arenae* Cal35, Ter10 and Ter282, *C. pratensis* Ter91, Ter291). Other genera taxonomically close to *Collimonas* were chosen : 2 belonging to the *Glaciimonas* genus (*Glaciimonas* sp. PCH181 and GS1), one to *Janthinobacterium*, 2 to *Herbaspirillum* (*H. rubrisubalbicans* and *H. seropidecae*) and one to *Burkholderia cepacia*. In addition, we selected the sequences of the large subunit of a set of GMC oxidoreductase which function was demonstrated: a gluconate dehydrogenase (GADH ; BAH80545.1) and a sorbitol dehydrogenase (BAD60913.1) from *Gluconobacter frateurii* (Toyama *et al.* 2005; Saichana *et al.* 2009), a fructose dehydrogenase large subunit of *Gluconobacter japonicas* (BAM93252.1) (Kawai *et al.* 2013). We also considered the sequences of the large subunit of a putative sorbitol dehydrogenase from *Gluconobacter oxydans* H24 (AFW02570.1) and a dehydrogenase subunit from *Pantoea agglomerans* (AAF21261.1). The same genome resources were also used to recover the pqq-genes as well as the pqq-dependent enzymes.

Statistical analysis

Statistical analyses were performed in R software. Data shown were means of, at least, triplicates. Differences between sample's means were analysed by ANOVA and Tukey HSD tests.

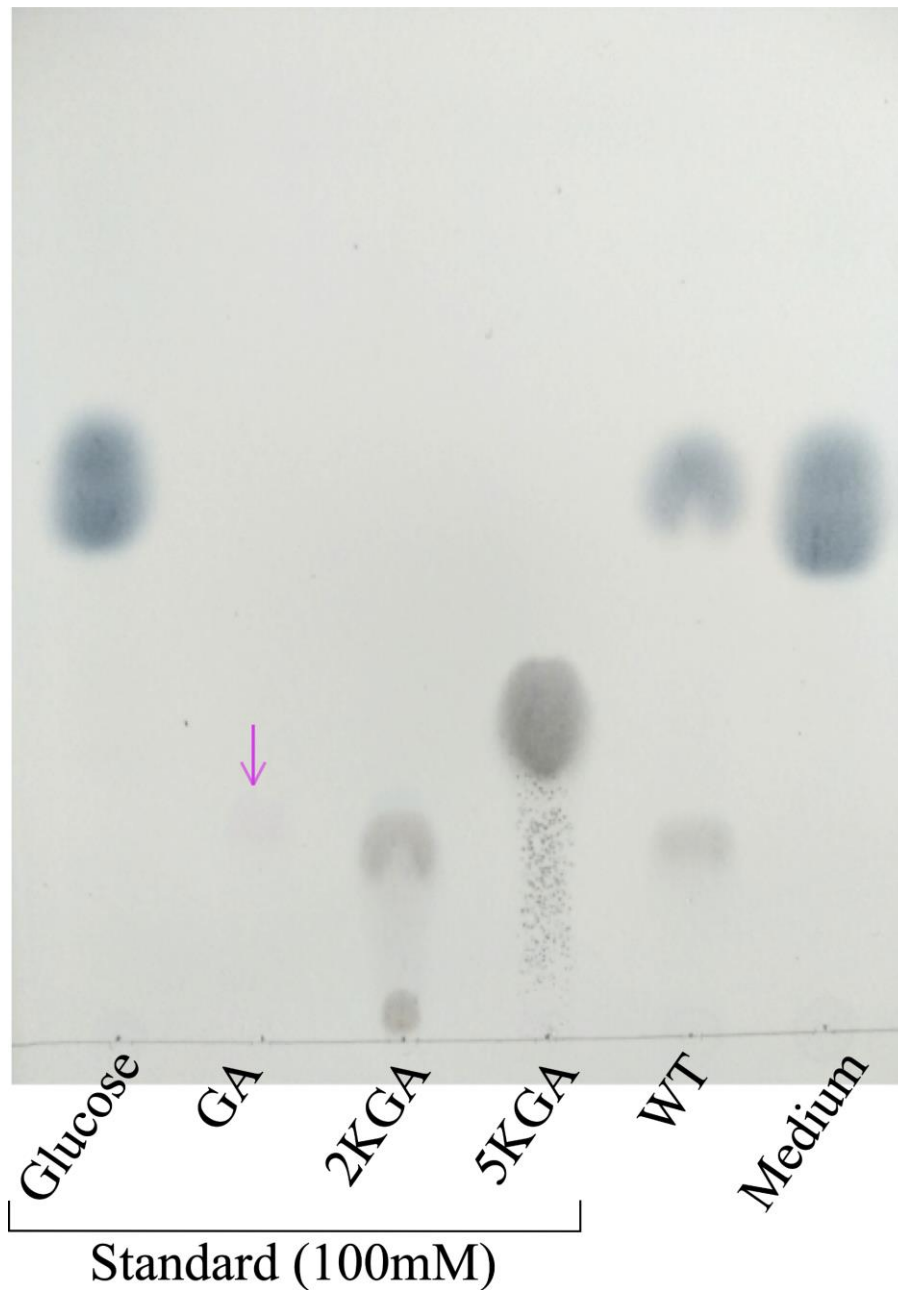


Figure 1: Thin layer chromatography analysis of gluconic acid production by the wild type strain PMB3(1) of *Collimonas pratensis*.

A volume of 8 μ l of supernatant of ABm culture was spotted on the TLC. Cultures were done in ABm medium supplemented with 10 g/l of glucose inoculated or not with the WT strain PMB3(1). The supernatant was recovered after 4 days of incubation at 25°C. A volume of 4 μ l of standards was spotted on the TLC. Standards correspond to 100 mM solutions of glucose, gluconate, 2KGA and 5KGA. After revelation, glucose appeared in dark blue spots, gluconate in pink, 2KGA in brown and 5KGA in dark purple spot. The pink arrow indicates the pink spot of the gluconate standard.

Nucleotide sequence accession number

The nucleotide sequence reported in this paper are related to the genome sequence of the strain PMB3(1), which has been deposited in the GenBank database under accession no. WXXL00000000.

RESULTS

Genomic and physiological characterization

At the genomic level, the detailed analysis of the genome of strain PMB3(1) did not permit to evidence any PQQ-dependent GDH nor the presence of the PQQ cofactor encoding genes. Similarly, none of the *Collimonas* genome available in the international databases (*i.e.*, *Collimonas* sp. PA-H2, *C. fungivorans* Ter331 and Ter6, *C. arenae* Cal35, Ter10 and Ter282, *C. pratensis* Ter91, Ter291) possess PQQ encoding genes and/or PQQ-dependent enzymes, suggesting that alternative MW pathways exist in collimonads.

At the chemical level, high concentrations of gluconic acid were detected in the supernatant of cultures of strain PMB3(1) done with glucose (Table 2), evidencing that this strain was capable of converting glucose to gluconic acid (GA) through an alternative, PQQ-independent pathway. Noticeably, the thin layer chromatography analyses confirmed the large production of gluconic acid, but also a weak production of 2 keto-gluconic acid (2KGA) by strain PMB3(1) as evidenced by the comparison with the migration retention factor (Rf) and the colour of the synthetic GA and 2KGA controls used (Fig. 1; Table 2). A kinetic analysis confirmed the continuous accumulation of GA, while 2KGA was hardly detectable. Interestingly, the growth assays done in minimal medium supplemented with a single source of carbon (*i.e.*, glucose, GA, 2KGA or 5KGA) confirmed that glucose, GA and 2KGA were used as carbon source by strain PMB3(1), but not 5KGA. Among them, glucose was the sole carbon which metabolism allowed an acidification of the culture supernatant (pH=3.5), while the pH did not change in presence of GA and 2KGA (*i.e.*, pH=6.2).

Isolation of mutants affected in the ability to solubilize inorganic phosphorous

The first high throughput screening of the mutant library allowed us to recover a total of 4 mutants (*i.e.*, 25(10F), 31(11B), 34(11H), 59(7B)) impaired in their ability to solubilize inorganic phosphorous (Pi).

The use of the calibrated procedure (see materials and methods) confirmed that these 4 mutants were significantly altered in their ability to solubilize Pi ($P < 0.05$). Based on this second screening, three of these mutants, 25(10F), 31(11B), 34(11H), did not present a solubilisation

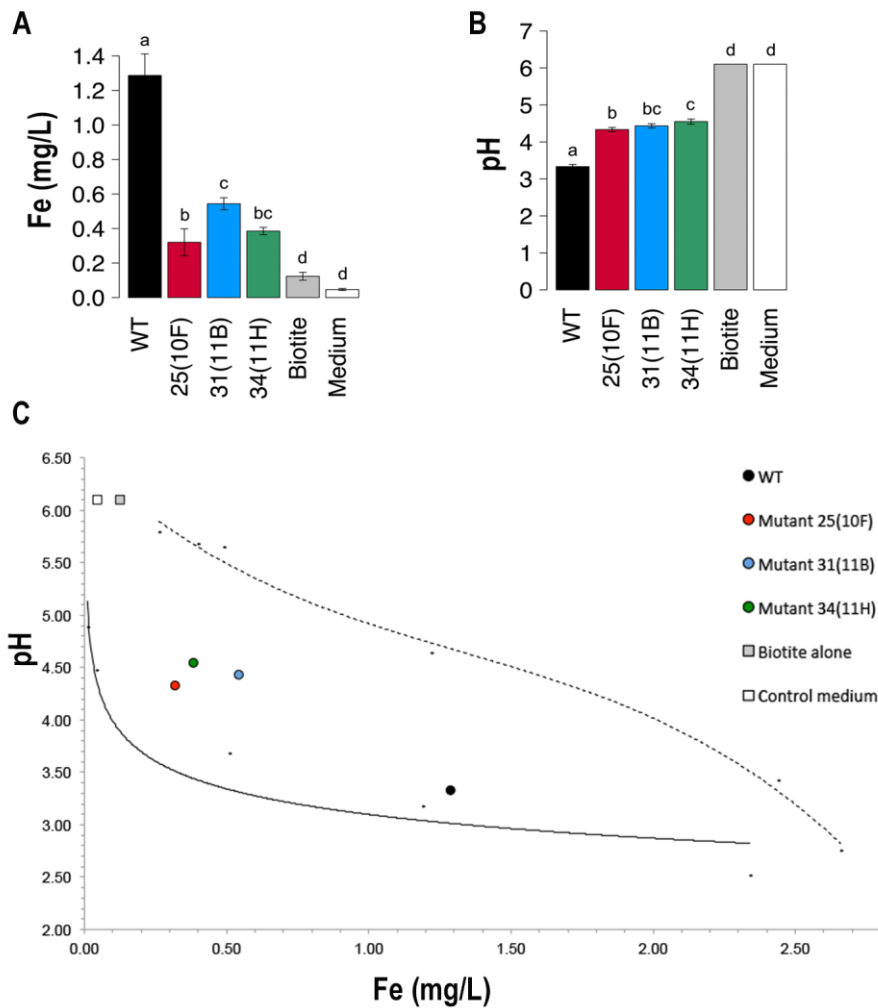


Figure 2: Biotite dissolution assay by the WT and mutant strains

(A) Measure of iron released from biotite after 7 days of incubation at 25°C in BHm supplemented with (2 g/l) glucose ; (B) Measure of pH measurement with bromocresol green. The control treatment termed ‘Biotite’ corresponds to the non-inoculated treatment. It allows the measurement of the spontaneous release of iron from biotite in the medium in our experimental conditions. The second control termed ‘medium’ corresponds to the non-inoculated medium without biotite. Each value is the mean of three independent replicates \pm the standard error of the mean. Measures with different letters are significantly different according to an ANOVA test ($P < 0.05$) ; (C) Individual mineral-weathering potentials (pH versus Fe released) of the WT strain and related MW mutants. White and grey squares correspond to the controls of the experiment (white, medium without biotite and non inoculated; grey, medium with biotite and non inoculated). The two curves indicate the mineral-weathering effect of a complexing agent (citric acid) (dashed line) and a strong acid (hydrochloric acid) (solid line).

halo (Table 2). For the mutant 59(7B), a reduction of 34% of the halo diameter was observed compared to the WT strain (halo_WT: 0.79 cm \pm 0.04 vs halo_59(7B): 0.52 cm \pm 0.1). All these mutants and WT presented similar colony diameters. The acidification assay revealed that the ability of mutants 25(10F), 31(11B) and 34(11H) to acidify was significantly reduced ($P < 0.05$). Indeed, while the WT strain and mutant 59(7B) acidified the medium from the initial pH 6.5 to pH 3.7 in three days, mutants 25(10F), 31(11B), 34(11H) acidified the medium only to *c.a.* pH 4.7 (average value).

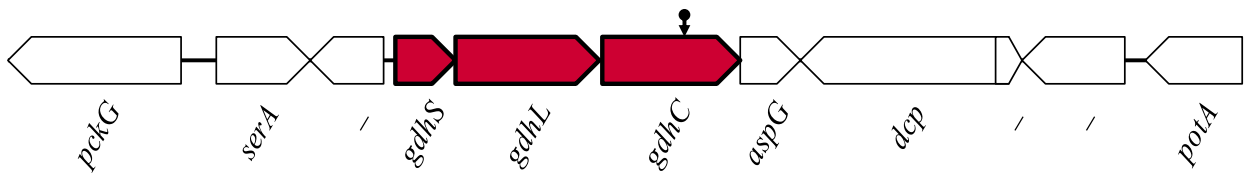
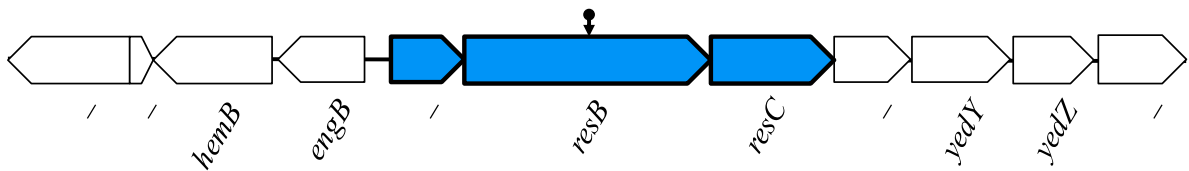
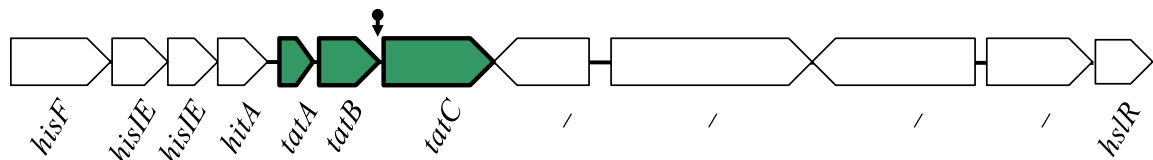
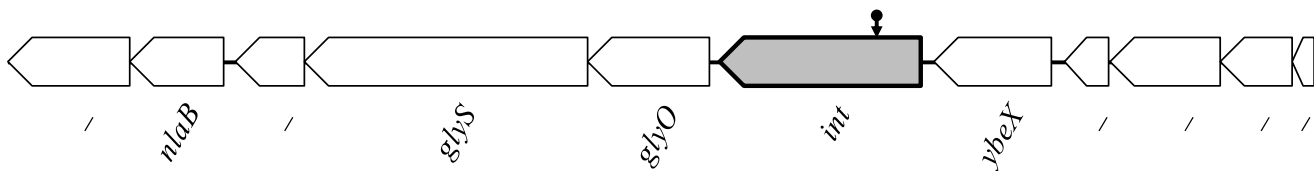
Ability to weather biotite

The ability to weather a complex mineral was tested only for the three mutants totally impaired in their ability to solubilize Pi (*i.e.*, 25(10F), 31(11B), 34(11H)) as well as for the WT strain (Fig. 2). After a 7-day incubation in presence of glucose as carbon source, the WT strain was able to release 1.29 ± 0.13 mg/l of iron in the solution. In comparison, the three mutants 25(10F), 31(11B) and 34(11H) released significantly less iron (0.32 ± 0.08 , 0.54 ± 0.04 and 0.39 ± 0.02 mg/l, respectively) ($P < 0.05$) (Fig. 2A). Those values corresponded to a maximal reduction of 75% for mutant 25(10F) and a minimal reduction of 58% for mutant 31(11B) compared to the WT strain. After the 7-day incubation, the WT strain decreased the pH of the culture supernatant to $\text{pH} = 3.3 \pm 0.1$, while the mutants reached significantly higher value (4.3 to 4.5; $P < 0.05$) (Fig. 2B). The co-visualization of the quantity of iron released from biotite and of the pH of the supernatant confirmed the strong perturbation of the mineral weathering ability of the mutants compared to the WT strain (Fig. 2C).

Sequence analyses of the genomic region for the different mutants

The genomic region flanking the plasposon insertion of each mutant was isolated by self-cloning using the plasposon rescue method. For each mutant, 3 independent clones were recovered, sequenced and blasted against the genome sequence of strain PMB3(1). This revealed a single genomic region per mutant, demonstrating a unique plasposon insertion event in each of the mutants considered [25(10F), 31(11B), 34(11H), 59(7B)]. The sequences were also blasted against nucleic acid and protein databases of the NCBI for homologous sequences.

In mutant 25(10F), the plasposon is inserted in a gene we named *gdhC* (NKI70796.1). This gene presented high homology with a cytochrome c subunit of a Glucose/Gluconate/Sorbitol 2-dehydrogenase (Fig. 3, Table 3). Pfam analysis highlighted two conserved domains (cytochrome c from 36 to 137 aa/ cytochrome CBB3 from 322 to 406 aa ; e-value = $6.6e-07$ / $5.4e-10$, respectively) corresponding to a cytochrome c oxidase protein. This gene is preceded

A Mutant 25(10F)**B** Mutant 31(11B)**C** Mutant 34(11H)**D** Mutant 59(7B)**Figure 3: Genomic region of the plasposon insertion in the different mutants**

For each mutant, the genes have been represented with large horizontal arrows and their length was scaled according to their nucleotidic size. The genes or group of genes directly impacted by the Tn5-OT182 insertion are filled with colour. The small black arrow indicates the location of the insertion of the Tn5-OT182 in the genome of PMB3(1) as identified by BlastN for the mutants 25(10F) (**A**), 31(11B) (**B**), 34(11H) (**C**) and 59(7B) (**D**). Gene annotation is presented under each gene and the complete description is provided in Table 2 and in the supplementary Table S1, S2 and S3 (Supporting Information).

by two genes presenting sequence homology with subunits of a Glucose/Methanol/Choline (GMC) oxidoreductase. The first one presented high sequence homology (98 %) with the large subunit (NKI70795.1; *gdhL*) belonging to the FAD flavoprotein oxidoreductases, while the next gene presented high homology (80 %) with the gamma subunit (NKI70794.1; *gdhS*) of a Sorbitol/Glucose/2-Keto-D-Gluconate dehydrogenase. Pfam analysis revealed that this gamma subunit presented high sequence similarities with the FAD-Sorbitol dehydrogenase family protein (e-value = $2.5 \cdot 10^{-48}$) and carried a potential TAT-signal.

In mutant 31(11B), the plasposon is inserted in a genomic region presenting high sequence homology with a *resB* homologous gene (NKI71673.1 ; 94% identity with cytochrome c biogenesis protein ResB in *Collimonas sp.* PA-H2) (Fig. 3, Table S1). This gene belongs to a genetic structure composed of 3 genes (NKI71672.1; NKI71673.1 ; NKI71674.1) involved in cytochrome c biogenesis /maturation. Among them, gene NKI71672.1 codes for a cytochrome c4 immature protein and gene NKI71673.1 is gene *resC* coding for a cytochrome c biogenesis protein. In the vicinity of the *resB* gene, two other genes, *yedY* and *yedZ* (NKI71676.1, NKI71677.1), presenting high sequence homology with a sulfite oxidase were detected.

In mutant 34(11H), the plasposon is inserted in a genomic region presenting high sequence homology with the Twin Arginine Translocation pathway (TAT) operon (*tatABC*). The insertion was localized between the gene *tatB* (NKI71758.1; 93% identity with Sec-independent protein translocase subunit TatB in *Collimonas sp.* PA-H2) and *tatC* (NKI71759.1; 95% of identity with the twin-arginine translocase subunit TatC in *Collimonas sp.* PA-H2) (Fig. 3, Table S2).

In mutant 59(7B), the plasposon is inserted in the gene *int* (NKI72639.1) presenting high sequence homology with an apolipoprotein N-acyltransferase (92% of identity with the apolipoprotein N-acyltransferase of *Collimonas sp.* PA-H2) (Fig. 3, Table S3). This enzyme is responsible for the last step of lipoprotein maturation. In the vicinity of this gene, 5 genes involved in metabolism and two genes involved in information storage and processing were identified according to their COG class.

Identification of TAT-dependent proteins

Due to the localization of the plasposon insertion of mutant 34(11H) in the TAT system region, a bioinformatic analysis was done to identify all proteins presenting a putative TAT signal in the genome of strain PMB3(1). Indeed, the perturbation of the MW ability may be related to a protein carried by the TAT system. This screening allowed the identification of 74 TAT-proteins related to different Clusters of Orthologous Groups (COG) (metabolism, cellular

Table 3: Description of the genomic region of the plasposon insertion in the mutant 25(10F)

Accession number	Putative function	Gene annotation	Length (nt)		BLASTP (%Id against NCBI)	
NKI70791.1	Phosphoenolpyruvate carboxykinase [GTP] (PEP carboxykinase) (PEPCK)	pckG	1881	96 %	Phosphoenolpyruvate carboxykinase (GTP)	Collimonas sp. PA-H2 [WP_098497426.1]
NKI70792.1	D-3-phosphoglycerate dehydrogenase	serA	990	96 %	D-2-hydroxyacid dehydrogenase family protein	Collimonas sp. PA-H2 [WP_098494666.1]
NKI70793.1	Conserved protein of unknown function	_	786	96 %	L-asparaginase	Collimonas sp. PA-H2 [WP_098497427.1]
NKI70794.1	Sorbitol/glucose/2-Keto-D-gluconate dehydrogenase, membrane-bound, small subunit	gdhS	633	80 %	2-Keto-D-gluconate dehydrogenase, membrane-bound small subunit	Collimonas fungivorans [WP_014008399.1]
NKI70795.1	Glucose/Methanol/Choline dehydrogenase large subunit	gdhL	1602	98 %	GMC family oxidoreductase	Collimonas sp. PA-H2 [WP_098494668.1]
NKI70796.1	Glucose/Gluconate/Sorbitol 2-dehydrogenase cytochrome subunit	gdhC	1407	94 %	Cytochrome c	Collimonas sp. PA-H2
NKI70797.1	Asparaginase	aspG	486	96 %	Asparaginase	Collimonas sp. PA-H2 [WP_098494670.1]
NKI70798.1	Peptidyl-dipeptidase dcp	dcp	2190	93 %	Peptidyl-dipeptidase Dcp	Collimonas sp. PA-H2 [PFH09692.1]
NI*	Protein of unknown function	_	177	46 %	Hypothetical protein	Pectobacterium carotovorum [WP_094430314.1]
NKI70799.1	Porin, Gram-negative type	_	1077	95 %	Porin	Collimonas sp. PA-H2
NKI70800.1	Spermidine Putrescine transport ATP-binding protein potA	potA	1092	91 %	ABC transporter ATP-binding protein	Collimonas sp. OK607 [WP_092433278.1]

*Some of the proteins listed have not been identified (NI) according to the prediction tools used by NCBI, but were predicted in the MICROSCOPE platform

processes and signalling, information storage and processing, or poorly characterized (Table S4; Fig. S1). Among them, we noticeably identified the protein *gdhS* that corresponds to the gamma subunit of the Sorbitol/Glucose/2-Keto-D-Gluconate dehydrogenase gene (NKI70794.1). This gene is in an operon along with gene *gdhC* (*i.e.*, cytochrome subunit of the Sorbitol/Glucose/2-Keto-D-Gluconate dehydrogenase) interrupted in mutant 25(10F) (see fig. 3) Other enzymes related to putative alkaline phosphatases (*i.e.*, PhoD like, NKI71510.1 and NKI72605.1), involved in cytochrome c biogenesis (NKI72023.1) or presenting an oxidoreductase activity (NKI71676.1) were also identified in the list of TAT-proteins.

Functional and physiological characterization of mutants 25(10F), 31(11B) and 34(11H)

Cytochrome activity

As mutants 25(10F) and 31(11B) were affected on genes encoding a cytochrome subunit or involved in the biogenesis of cytochrome c, a cytochrome oxidase test was performed on all mutants. This qualitative test based on the oxidation of Tetramethyl-p-phenylene diamine (TMPD) revealed that the three mutants formed a purple pigment as the WT strain (Table 2), revealing that the cytochrome c oxidase of the strain PMB3(1) was still functional in all the mutants. This result highlights that strain PMB3(1) possesses several cytochrome c biogenesis systems independent on the *resB/resC* system interrupted in mutant 31(11B). Indeed, a genome analysis revealed that the strain PMB3(1) possesses two cytochrome biogenesis loci.

Detection and quantification of organic acids

Ionic chromatography analyses permitted to identify the main acids produced (*i.e.*, Gluconate, oxalate, pyruvate, formate, and succinate) by the WT strain and mutants in presence of glucose (Table 2). Gluconate was the major organic acid detected in the WT culture supernatant, reaching a concentration of 878.7 ± 3.3 mg/l, while all other organic acids are present at very low concentrations (pyruvate: 2.87 mg/l; succinate: 0.07 mg/l). Noticeably, gluconate was not detected in any of the supernatants from the 3 mutants (*i.e.*, mutants 25(10F), 31(11B) and 34(11H); Table 2). Amongst other organics, only pyruvate presented significant differences between the WT strain and mutants, but with very low concentrations (WT: 2.87 ± 0.63 mg/l; 25(10F): 1.08 ± 0.03 mg/l; 31(11B): 1.55 ± 0.23 mg/l and 34(11H): 0.11 ± 0.06 mg/l) ($P < 0.05$).

Growth in rich (LB) medium

To get a better understanding of the importance of the gene(s) interrupted in the different mutants, their growth was monitored for 120 hours in LB medium (Fig. 4; Table 2). No

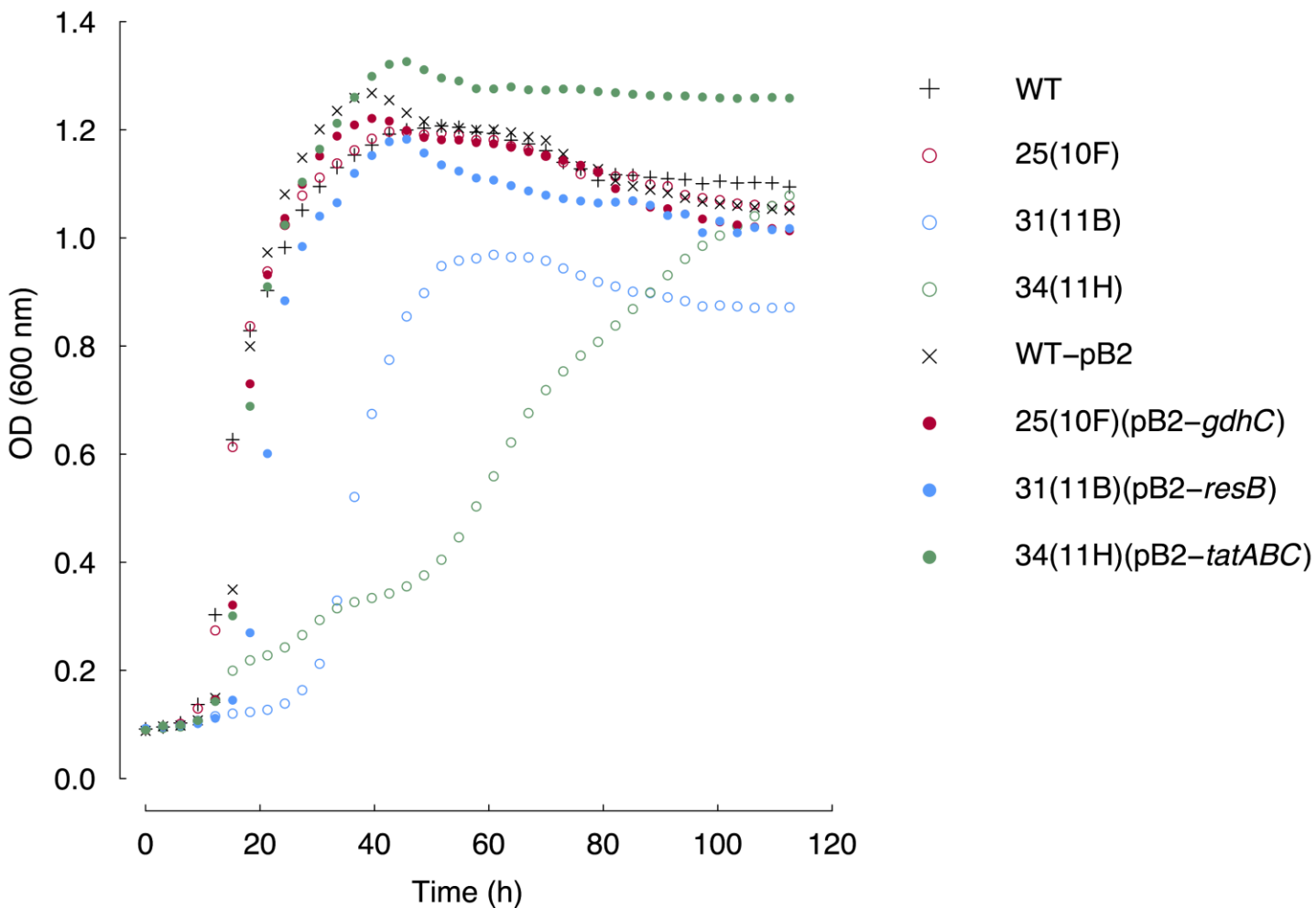


Figure 4: Growth test on WT, mutants and complemented mutants in LB broth

Growth monitoring of the wild type strain and of the mutants 25(10F), 31(11B) and 34(11H) complemented or not was done in LB medium over a period of 120 h. Growth was performed under orbital shaking and the measures correspond to absorbance measurement at $\lambda 600$ nm. Each point is the mean of 3 independent replicates. For legibility reason, the standard error was not presented.

difference between the WT and the 25(10F) mutant was observed. Indeed, the growth rate ($0.09 \pm 0.02 \text{ h}^{-1}$; $P < 0.01$), the lag time (ca. 10 h), the maximal growth yield ($\text{OD}_{595\text{nm}}$ of 1.20 ± 0.05) as well as the time necessary to reach the stationary phase for the WT and mutant 25(10F) (*i.e.*, 40 h) were similar. In contrast, mutants 31(11B) and 34(11H) differed significantly from the WT strain. Mutant 31(11B) presented a growth rate of $0.06 \pm 0.01 \text{ h}^{-1}$, a lag phase of 25 h, a maximal growth yield ($\text{OD}_{595\text{nm}}$) of 0.95 ± 0.08 and it required 50 h to reach the stationary phase. Mutant 34(11H) presented the lowest growth rate of $0.02 \pm 0.01 \text{ h}^{-1}$, a maximal growth yield ($\text{OD}_{595\text{nm}}$) of 1.08 ± 0.08 and it required 120 h to reach this maximum.

Impact of the carbon source on the acidification process

As acidification plays an important role in the mineral weathering process by strain PMB3(1), several carbon sources coming from the metabolism of glucose (*i.e.*, gluconate, 2KGA, 5KGA) were tested in minimal medium (BHm) (Fig. 5). Contrary to the strong acidification observed with glucose, these growth assays revealed no difference of pH between the WT and mutant strains when they were cultivated in minimal medium amended with glucose derivatives such as GA or 2KGA ($\text{pH}_{\text{WT}} = \text{pH}_{\text{mutant}} = 6.2$). No growth was observed with 5KGA.

Complementation analysis of the mutants

To confirm the involvement of the interrupted genes identified in the different mutants (*i.e.*, 25(10F), 31(11B) and 34(11H)) in the MW ability of strain PMB3(1), a functional complementation was performed. For each mutant, the native gene(s) under a constitutive promoter was cloned in the pBBR1MCS-2 vector. These constructions were then transformed in the corresponding mutant and tested with the same set of functional assays as described above. Noticeably, the quantitative assays performed on solid TCP medium revealed that the complemented mutants 25(10F)(pB2-*gdhC*) and 34(11H)(pB2-*tatABC*) recovered fully their mineral weathering ability to WT effectiveness (Table 2). The mutant 31(11B)(pB2-*resB*) was restored in its ability to weather mineral, but presented a slightly lower efficiency than the WT strain, when harbouring gene *resB* on the pBBR1MCS-2 plasmid. Regarding acidification, upon complementation pH was further reduced from $\text{pH } 5.1 \pm 0.1$ observed in the mutants to 4.4 ± 0.1 in the complemented mutants after 3 days, which was not significantly different from that observed with the WT strain harbouring the empty vector pBBR1MCS2 (4.3 ± 0.1). In addition, the restoration of the glucose dehydrogenase activity was observed in the complemented mutants. Last, complementation restored growth of all mutants (Fig. 4).

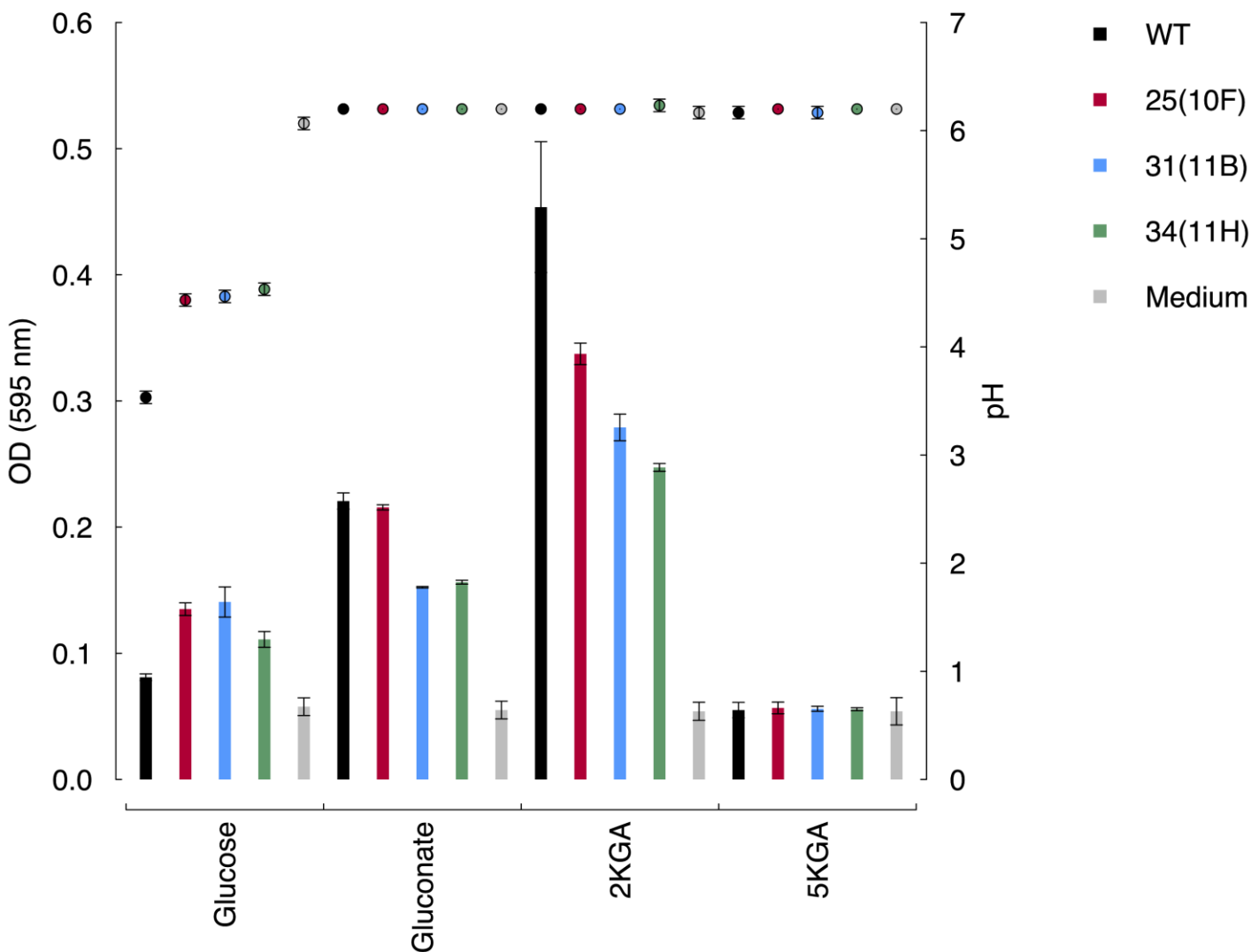


Figure 5: Acidification ability and growth on different carbon sources for the WT and mutants strains

The acidification (right axis) after 5 days of incubation at 25°C of the BHm medium with different carbon source (glucose, gluconate, 2keto gluconate and 5-keto gluconate) is presented by coloured circles according to the strain considered. The absorbance at 595 nm (left axis) representing the growth of the different strains is presented by coloured bars. The non-inoculated medium was used as control. Each value is the mean of three independent replicates \pm the standard error of the mean.

Bioinformatic properties and conservation of GMC oxidoreductases in the collimonads and related genera

For bacteria carrying a glucose dehydrogenase enzyme of the GMC oxidoreductase family, the conversion of glucose to gluconic acid is mainly performed by the large subunit (*i.e.*, *gdhL*) of the enzyme (Yamaoka *et al.* 2008). In this context, bioinformatic analyses were performed on this subunit to analyse its properties and its conservation among collimonads and related taxa. In strain PMB3(1), this approach allowed to identify a single GMC oxidoreductase organized in three subunits and corresponding to the genomic region described above for mutant 25(10F). A second homologous of the large subunit (*GdhL*) was also identified in strain PMB3(1), but with a low identity (20%). Contrary to the GMC oxidoreductase, this homologue is organized as a single unit (*i.e.*, one gene) and encodes a putative choline dehydrogenase. The pfam analysis done on the sequence of the large subunit of the strain PMB3(1) evidenced the presence of a Rossmann-like domain (amino acid 11 to 41; e-value = 2.0e-5) and two GMC oxidoreductase domains (domain C: 405 to 525, e-value 1.5e-18; domain N: 176 to 318, 1.5e-5), supporting by this way the function attributed to the gene identified in our study (*i.e.*, a Glucose dehydrogenase from the GMC oxidoreductase family) (Fig. S2). Notably, all the GMC oxidoreductases described in the literature present the 3 domains detected (Rossmann, GMC_N, GMC_C) and all are specifically associated to enzymes binding FAD as cofactor (*i.e.*, gluconate dehydrogenase, GADH; glucose dehydrogenase, GDH; fructose dehydrogenase, FDH; sorbitol dehydrogenase, SDH) (Kataoka *et al.* 2015; Toyama *et al.* 2005).

The comparison of homologous sequences from the available *Collimonas* genome sequences revealed a very good conservation of the different domains (Fig. S3). In the putative FAD domain, only two positions on a total of 31 varied among the collimonads (Fig. S2). In the GMC_C domain, 10 positions on a total of 86 varied, while 16 positions on a total of 121 varied in the GMC_N domain (Fig. S2). Beside these pfam domains, we also detected in the large subunit sequence of strain PMB3(1), the cysteine-rich region (cys208, cyst214, cys218 in our alignment; Fig. S2) identified by Shiota *et al.* (2016) as specific of the FAD-dependent dehydrogenases. This region is constituted by three conserved cysteine (Cys) residues (CCGNNNCMPICP), all conserved in the *Collimonas* genomes considered. This particular site constitutes an iron-sulfur cluster essential for electron transfer from FAD to the cytochrome c subunit (Shiota *et al.* 2016).

When the sequence comparison integrated neighbouring genera, it revealed a good conservation of the large subunit sequence among the taxa tested and a stronger relatedness of *Janthinobacterium* and *Glaciimonas* with *Collimonas*. In contrast, *Herbaspirillum* presented

important variations (Fig. S3). The sequence of the GdhL protein of strain PMB3(1) presented ca. 90 % of identity with that of strains PCH181 and GS1 of *Glaciimonas* sp., 80 % with that of *Janthinobacterium* and only 50 % with that of *Herbaspirillum seropedicae* and *H. rubrisubalbicans*. The low relatedness of the GdhL of *Herbaspirillum* was also visible in the sequence alignment, especially in the domain GMC_C.

Last, a sequence comparison between the large subunit of strain PMB3(1) and the large subunit of FAD-dependent dehydrogenases for which the function and/or the FAD-dependence were experimentally demonstrated (*i.e.*, a GADH from *Gluconobacter frateurii*, two SDHs from *Gluconobacter oxydans* and *G. frateurii*, a FDH from *Gluconobacter japonicas* and a GDH from *Burkholderia cepacia*) or suspected (choline dehydrogenase (CDH) from *Pantoea agglomerans*) was performed (Fig. S3). This analysis revealed that the most distantly related sequence was the GADH. The positions on the phylogenetic tree are supported by the strong sequence variations observed in the sequence alignment. The large subunit sequence of strain PMB3(1) appeared also poorly related to the FDH and SDH. The stronger relationship was observed with the glucose dehydrogenase (GDH) from *Burkholderia cepacia* (Tsuya *et al.* 2006).

DISCUSSION

The ability to weather minerals was evidenced for a broad range of bacterial genera, but the genes involved have been poorly investigated and characterized. To date, the main system described is related to the PQQ-dependent glucose dehydrogenases (PQQ-GDH), which allows the production of protons and gluconic acid. The role of such enzymes and the related *pqq* genes (*i.e.*, *pqqABCDEF*) in the solubilisation of highly weatherable minerals (*i.e.*, Pi) was reported in several studies (Goldstein, 1995; Goldstein *et al.* 2003; Babu-Khan *et al.* 1995), but only recently for a complex mineral (*i.e.*, biotite; Wang *et al.* 2020). In this study, we investigated the molecular mechanisms and the genes explaining the high MW effectiveness of strain PMB3(1) of *Collimonas* as well as their relative conservation among collimonads.

Collimonads have been isolated from various nutrient-poor environments (*i.e.*, sand dune, forests soil) and in fungal rich habitats (*i.e.*, mycorrhizosphere) (Colin *et al.* 2017; Uroz *et al.* 2007; Lepleux *et al.* 2012). They are recognized as particularly effective at mobilizing nutrients using fungal derived metabolites such as glucose, trehalose, mannitol (Uroz *et al.* 2009b). The genome analysis performed in this study reveals that none of the sequenced *Collimonas* to date possess the canonical *pqq* biosynthesis genes nor PQQ-dependent enzymes, meaning that alternative mechanisms to the PQQ-dependent pathway are involved in their MW ability. Those

results confirmed the observations made on the Ter *Collimonas* strains (Ter331, Ter14, Ter6, Ter91 or Ter10; Mela *et al.* 2012) or on strain PMB3(1) (Picard *et al.* 2020). In this study, we confirmed that strain PMB3(1) is very effective at weathering and at producing gluconic acid, and we showed for the first time that at least a part of this gluconic acid is converted to 2-keto-gluconic acid (2KGA), evidencing the presence of a glucose dehydrogenase (GDH) activity and of a gluconate dehydrogenase (GADH) activity. Such conversion of glucose to gluconic acid and then to 2KGA corresponds to the direct oxidative pathway described by Ebert *et al.* (2011). The 2KGA is then converted into 6-P-gluconate by a 2-keto gluconate kinase and a 2-keto gluconate 6-phosphate reductase prior to entering the Pentose pathway or the Entner-Doudoroff pathway (Ebert *et al.* 2011). Beside its capability to produce gluconic and 2-keto-gluconic acids, we demonstrated that strain PMB3(1) is capable of metabolizing these two acids, without acidification of the solution. No growth was observed with the 5-keto-gluconic acid. The ability to produce GA and 2KGA is well conserved among Gram-negative bacteria, but the production of 5KGA or 2,5KGA is more specific to acetic bacteria such as *Acetobacter* or *Gluconobacter* (Sützl *et al.* 2019). Bacteria producing GA and 2KGA have been described as being more effective at solubilizing calcium phosphate than other bacteria (Babu-Khan *et al.* 1995).

A focus on the genomic region flanking the plasposon insertion in mutant 25(10F) allowed a better understanding of the link between the 3 weathering null mutants, though they were geographically distant and apparently unrelated. We identified a PQQ-independent enzyme presenting high homology with Glucose/Methanol/Choline (GMC) oxidoreductases (Sützl *et al.* 2019; Cavener, 1992). The GMC superfamily encompasses a wide variety of FAD-dependent oxidoreductases (*e.g.*, glucose oxidase (GO), glucose dehydrogenase (GDH), alcohol oxidase (AO), cellobiose dehydrogenase (CDH)) that are present in both prokaryotic and eukaryotic domains (Sützl *et al.* 2019; Zamocký *et al.* 2004). They are composed of three subunits encoding a small subunit, a large subunit, and a cytochrome c subunit (Sützl *et al.* 2019; Cavener, 1992), corresponding exactly in term of organization (small subunit: *gdhS*; large subunit: *gdhL* and cytochrome subunit: *gdhC*) and sequence homology to the genomic region impacted in mutant 25(10F). The large subunit of strain PMB3(1) is characterized by several domains according to pfam analysis (a FAD domain and two GMC oxidoreductase domains (N and C)) and the presence of a cysteine rich region. This cysteine rich region was shown to be conserved in the catalytic large subunit of FAD-dependent dehydrogenases (Shiota *et al.* 2016). While we were able to demonstrate the GDH activity and the production of gluconic acid by strain PMB3(1), testing experimentally the FAD dependence of the GDH activity would require

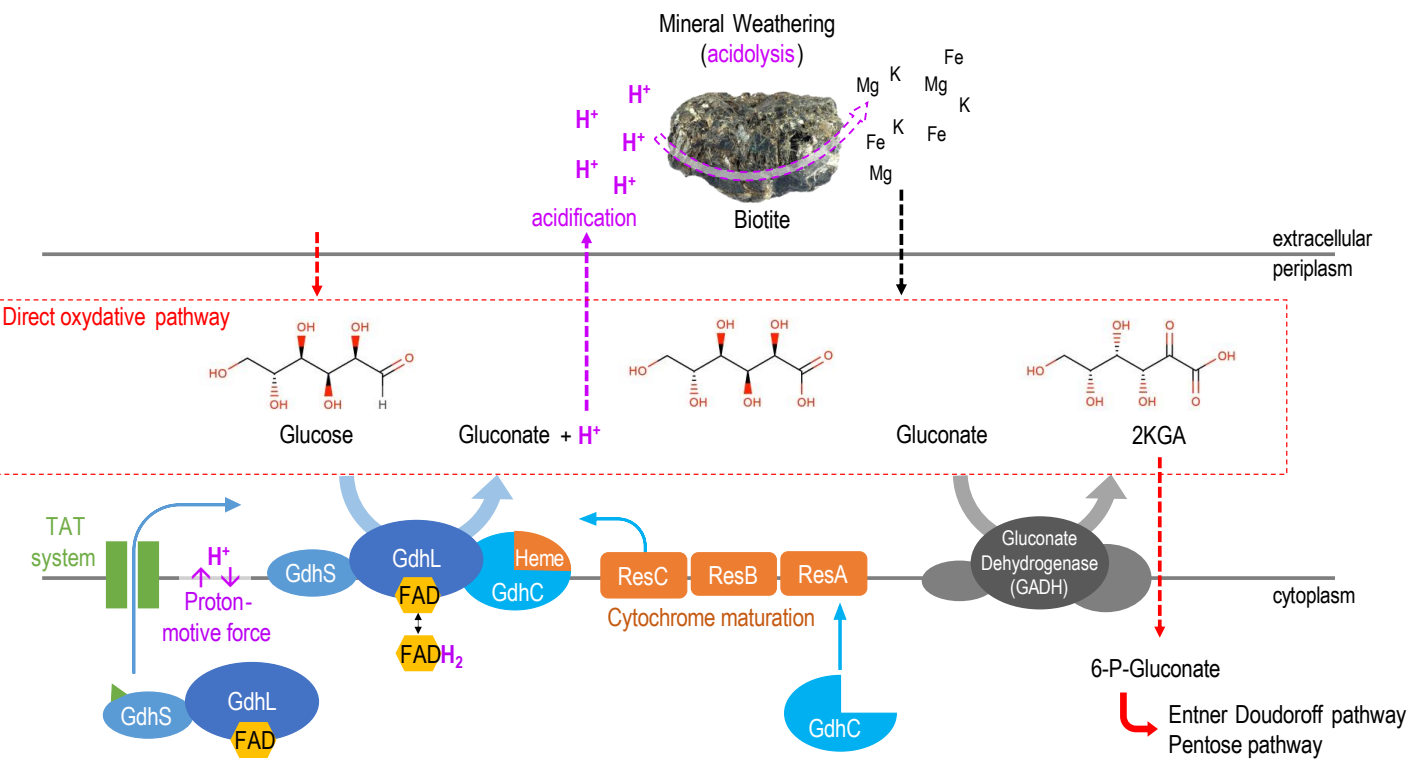


Figure 6: Molecular mechanisms of PQQ-independent GDH in mineral weathering process of *Collimonas pratensis* PMB3(1).

The hypothetical functional model presented in herewas generated based on the data extracted in this study and from the literature. The GDH of the strain *Collimonas pratensis* PMB3(1) is composed of three subunits GdhS, GdhL and GdhC (blue). The GdhL subunit is able to bind the cofactor FAD (yellow) in the cytoplasm. The complex GdhS-GdhL is formed in the cytoplasm and then transported in the periplasm. This transfer is done through the Twin Arginine Translocation system (green), due to the presence of a TAT signal of the GdhS subunit. The functioning of the TAT system is based on the proton motive force. The cytochrome subunit (GdhC) is matured by the ResABC system (orange) and translocated in the periplasm where it fixes heme. The GDH converts glucose in gluconate (GA) and protons (pink). Gluconate is then converted to 2-Keto-gluconate (2KGA) by the gluconate dehydrogenase (grey). The conversion of glucose to gluconic acid and then to 2KGA corresponds to the direct oxidative pathway (dotted red box). The 2KGA can go to the cytoplasm where it is then converted into 6-P-gluconate by a 2-keto gluconate kinase and a 2-keto gluconate 6-phosphate reductase prior to enter in the Pentose or the Entner-Doudoroff pathways. Both GA and 2KGA support the growth of strain PMB3(1). Protons produced by GDH activity lead to an acidification of the extracellular environment and permit the dissolution of minerals through acidolysis. The mineral weathering makes nutrients available to bacteria.

the purification of the three subunits in a functional form, which was not possible in our labs. A FAD dependence test performed on lysed cells was inconclusive. The known FAD-dependent GDHs are involved in the oxidation of different substrates including sugars, alcohols, cholesterol and choline and their conversion to the corresponding lactone. In presence of glucose, these enzymes allow the production of D-glucono-1,5-lactone, which is then converted to gluconic acid through the action of a gluconolactonase or spontaneous hydrolysis (Ferri *et al.* 2011; Zamocký *et al.* 2004). Strain PMB3(1) possesses several putative gluconolactonases (NKI70323.1, NKI67822.1, NKI72143.1) in its genome. Although additional experiments are required to support the different steps, we proposed here a hypothetical functional model of the main mechanisms used by strain PMB3(1) to weather minerals and linking the different mutants obtained in this study (Fig. 6).

To be functional GMC oxidoreductases also require a mature cytochrome c subunit and a small subunit. The maturation of the cytochrome c subunit is performed through the ResB and ResC system (Crow *et al.* 2005), which allows the translocation of the heme during cytochrome maturation (Kranz *et al.* 2009). Without the heme, the cytochrome c subunit is not functional and does not permit electron transfer. Strain PMB3(1) possesses both ResB and ResC system and very interestingly the *resB* gene is interrupted in our mutant 31(11B), likely interrupting the maturation of the cytochrome c subunit of the GDH identified. Notably, its activity was restored when a complementation in *trans* was done with the gene *resB*. The last small subunit of the GMC oxidoreductases is a protein required for the proper folding and secretion of the large subunit (Shiota *et al.* 2016; Yamaoka *et al.* 2008). Indeed, without a functional small subunit, the GDH of *Burkholderia cepacia* strain SM4 failed to perform the oxidation of its substrate (Yamaoka *et al.* 2008). The small subunit of strain PMB3(1) is also characterized by a TAT-signal. This particularity was also observed in various dehydrogenases organised in three subunits. This strongly suggests that in absence of translocation of the small subunit, the related FAD-dependent enzyme is not functional. Congruent with this hypothesis, Toyama *et al.* (2007) showed that the assembly of the different subunits of the FAD-GADH of *Gluconobacter dioxyaceticus* was performed in the cytoplasm before the translocation through the TAT system and using the TAT signal of the small subunit. In addition, experimentations showed that TAT system allowed the translocation of folded proteins associated with their co-factor (Allen *et al.* 2002; Palmer and Berks, 2012). In this context, the TAT-signature of the PMB3(1) GdhS (*i.e.*, the small subunit of the GDH) represents the link between the mutant 34(11H) and the MW null phenotype. Besides the small subunit of the Glucose dehydrogenase (GdhS) of strain PMB3(1), several other TAT-exported proteins could

also play a role in MW, such as those involved in cytochrome biogenesis, oxidoreduction or more especially in the hydrolysis of organic phosphate (Table S4) (Chhabra *et al.* 2013 ; Lidbury *et al.* 2016). However, the complete loss of MW activity in the other two mutants (*i.e.*, 25(10F), 31(11B)) would not support this hypothesis.

The conservation of the MW ability among collimonads prompted us to determine the phylogenetic distribution of the GDH type identified in strain PMB3(1) in collimonads and closely related genera. The comparison done on the sequenced genomes of *Collimonas* (*C. pratensis*, *C. arenae*, *C. fungivorans*, *C. sp.*) revealed a good conservation of this GDH type as well as of the TAT system, and the absence of PQQ-dependent GDHs or the related *pqq* biogenesis genes in collimonads. Such conservation of the PQQ-independent GDH identified from strain PMB3(1) was expected, as *Collimonas* are known to harbour important gene conservation among the different species described (Mela *et al.* 2012). The comparison done between the large subunit of the GDH of strain PMB3(1) and other dehydrogenases FAD-dependent in other taxa revealed that it was more strongly related to *Glaciimonas*, *Janthinobacterium* and *Burkholderia* than *Herbaspirillum* or *Gluconobacter*. The GDH of PMB3(1) presented higher homology with other alcohol dehydrogenases experimentally identified as sorbitol (FW02570.1), glucose (AAN39686.1) or fructose (BAM93252.1) dehydrogenases, all FAD-dependent. This relative proximity between different type of FAD-dependent dehydrogenases may be due to the low substrate specificity of some of these enzymes, which are capable of oxidizing different substrates, including glucose (Yamaoka *et al.* 2008). In contrast, the most distantly related FAD-dependent dehydrogenase of our analysis was the GADH (*i.e.*, Gluconate DH; BAH80545.1) of *Gluconobacter frateurii* that converts gluconate to 2 ketogluconate. Beside the large subunit, the small and cytochrome subunits were also well conserved between collimonads and related taxa. The conservation of an homologous of the GDH of strain PMB3(1) in *Glaciimonas* and the presence of this taxa in nutrient-poor and rocky environments (*i.e.* the forest soil, alpine glaciers) (Udovičić *et al.* 2015) suggest that members of this genus are well adapted to oligotrophic conditions and capable of weathering minerals as are collimonads. Their MW ability remains to be tested. In contrast, important differences were found in the sequence of the GMC_C domain and the Cys-rich region of the large subunit of *Herbaspirillum*, a genus reported as non- or poorly-effective at weathering minerals (Uroz *et al.* 2009b). Beside the presence of a GMC oxidoreductase homologue, our genomic analyses revealed that some representative strains of the genus *Burkholderia*, *Glaciimonas*, *Gluconobacter* or *Pantoea* were also characterized by the presence of *pqq*-encoding genes as well as PQQ-dependent enzymes in their genome, but their ability to

solubilize minerals is unknown. Such results reveal that bacteria can possess both PQQ-dependent and -independent GDH. Interestingly, a dual transcriptomic and proteomic approach done on another effective MW bacterial strain (i.e. strain PML1(12) of *Caballeronia mineralivorans*) harbouring both systems highlighted that a homologous GMC oxidoreductase was up-regulated in presence of biotite, while the *pqq*-related genes appeared poorly expressed and not regulated (Uroz *et al.* 2020). This GMC oxidoreductase presented high sequence homology with the FAD-dependent GDH of *Burkholderia cepacia* strain SM4 and with the GDH identified in strain PMB3(1) in our study, suggesting that such enzyme may be broadly conserved in Burkholderiales.

CONCLUSION

This study elucidated the main molecular mechanism used by collimonads to weather mineral. Our results show that their effective MW ability is likely due to an enzymatic activity based on a PQQ-independent GMC-DH capable of oxidizing glucose to gluconic acid (*i.e.*, a PQQ-independent glucose dehydrogenase). This crucial step of the direct oxidative pathway leads to a high production of protons jointly with the oxidation of glucose and an important acidification of the nearby environment and consequently the dissolution of the minerals. This enzyme appears conserved among collimonads explaining their conserved effectiveness. The variations of sequence observed in the GMC_C domain of the large subunit of this enzyme may explain why some of the related taxa (*i.e.*, *Herbaspirillum*, *Janthinobacterium*) harbour a lower effectiveness at weathering minerals than collimonads. Our results represent the first demonstration that MW in bacteria is not exclusively explained by the PQQ-dependent GDH production of gluconate and that an alternative pathway based on a PQQ-independent GDH also exists in MW bacteria lacking the PQQ system. As such enzyme is largely distributed in Bacteria, Archaea and in some Eukaryotes (Sützl *et al.* 2019), it may open new perspectives in the understanding of the MW process by microorganisms and plants. Noticeably, our genomic analyses revealed that some bacteria harbour both the PQQ-dependent and PQQ-independent GDH in their genome as stated in some representative strains of the genus *Burkholderia*, *Glaciimonas*, *Gluconobacter* or *Pantoea* (this study; Uroz *et al.* in press). The next step for future researches will be to determine whether i) the GDH activity is regulated by the availability of inorganic nutrients (P, K, Mg...) as is the case for the PQQ-dependent GDH (Sasnow *et al.* 2016) or the presence/absence of a mineral (Uroz *et al.* 2020) and ii) the GDH genes can be used as biomarkers of the presence of the mineral weathering function into the soil.

ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by grants from the EC2CO program and the Labex ARBRE to S.U. L.P. was also supported by a fellowship from the French Ministère de l'Enseignement Supérieur, de la Recherche et de l'Innovation. The UMR1136 and UR1138 are supported by the ANR through the Laboratory of Excellence Arbre (ANR-11-LABX-0002-01). The authors thank Dr. P. Frey-Klett for helpful discussions, E. Morin for bioinformatics support and the MICROSCOPE team (Genoscope) for the support provided on the genome of strain PMB31.

REFERENCES

- Alder NN, Theg SM. Energetics of protein transport across biological membranes: A study of the thylakoid delta pH-dependent/cpTat pathway. *Cell Press*. 2003;112:231–242.
- Allen SCH, Barrett CML, Ray N, Robinson C. Essential cytoplasmic domains in the *Escherichia coli* TatC protein. *J Biol Chem*. 2002;277:10362–10366.
- Altschul SF, Madden TL, Schaffer AA, Zhang J, Zhang Z, Miller W and Lipman, DJ. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res*. 1997; 25:3389–3402.
- Babu-Khan S, Yeo TC, Martin WL, et al. Cloning of a mineral phosphate-solubilizing gene from *Pseudomonas cepacia*. *Appl Environ Microbiol* 1995;61:972–978.
- Balland C, Poszwa A, Leyval C, Mustin C. Dissolution rates of phyllosilicates as a function of bacterial metabolic diversity. *Geochim Cosmochim Acta* 2010; 74:5478–5493.
- Bendtsen J, Nielsen H, Widdick D, Palmer T, Brunak S. Prediction of twin-arginine signal peptides. *BMC Bioinformatics* 2005; 6:167.
- Bonneville S, Smits MM, Brown A, et al. Plant-driven fungal weathering: Early stages of mineral alteration at the nanometer scale. *Geology*. 2009; 37:615-618.
- Brantley SL. Kinetics of Mineral Dissolution, p. 151–210. In Brantley, SL, Kubicki, JD, White, AF (eds.), *Kinetics of Water-Rock Interaction*. 2008; Springer New York, New York, NY.
- Calvaruso C, Mareschal L, Turpault M-P, Leclerc E. Rapid clay weathering in the rhizosphere of norway spruce and oak in an acid forest ecosystem. *Soil Sci Soc Am J*. 2009; 73:331–338.
- Calvaruso C, Turpault M-P, Frey-Klett P. Root-associated bacteria contribute to mineral weathering and to mineral nutrition in trees: a budgeting analysis. *Appl Environ Microbiol*. 2006; 72:1258–1266.

- Calvaruso, C., Turpault, M. P., Leclerc, E., Ranger, J., Garbaye, J., Uroz, S., & Frey-Klett, P. Influence of forest trees on the distribution of mineral weathering-associated bacterial communities of the *Scleroderma citrinum* mycorrhizosphere. *Appl Environ Microbiol.* 2010;76:4780-4787.
- Cavener DR. GMC oxidoreductases: A newly defined family of homologous proteins with diverse catalytic activities. *J Mol Biol.* 1992; 223:811-814.
- Chhabra S, Brazil D, Morrissey J, Burke JI, *et al.* Characterization of mineral phosphate solubilization traits from a barley rhizosphere soil functional metagenome. *Microbiol Open* 2013; 2:717–724.
- Chilton M-D, Currier TC, Farrand SK, Bendich AJ, *et al.* *Agrobacterium tumefaciens* DNA and PS8 bacteriophage DNA not detected in crown gall tumors. *Proc Natl Acad Sci* 1974;71:3672–3676.
- Colin Y, Nicolitch O, Turpault M-P, Uroz S. Mineral types and tree species determine the functional and taxonomic structures of forest soil bacterial communities. *Appl Environ Microbiol.* 2017; 83:e02684-16.
- Collignon, C., Uroz, S., Turpault, M. P., & Frey-Klett, P. (2011). Seasons differently impact the structure of mineral weathering bacterial communities in beech and spruce stands. *Soil Biol and Biochem.* 2011;43:2012-2022.
- Crow A, Le Brun NE, Oubrie A. The role of ResA in type II cytochrome c maturation. *Biochem Soc Trans.* 2005; 33:149–151.
- Dennis JJ, Zylstra GJ. Plasposons: modular self-cloning minitransposon derivatives for rapid genetic analysis of Gram-negative bacterial genomes. *Appl Environ Microbiol.* 1998; 64:2710–2715.
- Derrien D, Marol C, Balesdent J. The dynamics of neutral sugars in the rhizosphere of wheat. An approach by ¹³C pulse-labelling and GC/C/IRMS. *Plant and Soil.* 2004; 267: 243-253.
- DeShazer D, Brett PJ, Carlyon R, Woods DE. Mutagenesis of *Burkholderia pseudomallei* with Tn5-OT182: isolation of motility mutants and molecular characterization of the flagellin structural gene. *J Bacteriol.* 1997; 179:2116–2125.
- Dilks K, Rose RW, Hartmann E, Pohlschroder M. Prokaryotic utilization of the Twin-Arginine Translocation pathway: a genomic survey. *J Bacteriol.* 2003; 185:1478-1483.
- Driessen AJ, Wickner W. Proton transfer is rate-limiting for translocation of precursor proteins by the *Escherichia coli* translocase. *Proc Natl Acad Sci.* 1991; 88:2471-2475.

- Ebert BE, Kurth F, Grund M, Blank LM, *et al.* Response of *Pseudomonas putida* KT2440 to increased NADH and ATP demand. *Appl Environ Microbiol.* 2011; 77:6597-6605.
- El-Gebali S, Mistry J, Bateman A, Eddy SR, *et al.* The Pfam protein families database in *Nucleic Acids Res.* 2019; 47:D427–D432.
- Ferri S, Kojima K, Sode K. Review of glucose oxidases and glucose dehydrogenases: A bird's eye view of glucose sensing enzymes. *J Diabetes Sci Technol.* 2011;5:1068–1076.
- Gadd GM. Geomycology: biogeochemical transformations of rocks, minerals, metals and radionuclides by fungi, bioweathering and bioremediation. *Mycol Res.* 2007; 111:3–49.
- Goldstein AH. Recent progress in understanding the molecular genetics and biochemistry of calcium phosphate solubilization by Gram negative bacteria. *Biol Agric Hortic.* 1995;12:185–193.
- Goldstein A, Lester T, Brown J. Research on the metabolic engineering of the direct oxidation pathway for extraction of phosphate from ore has generated preliminary evidence for PQQ biosynthesis in *Escherichia coli* as well as a possible role for the highly conserved region of quinoprotein dehydrogenases. *Biochim Biophys Acta BBA - Proteins Proteomics.* 2003; 1647:266–271.
- Gouy M, Guindon S, Gascuel O. SeaView Version 4: A Multiplatform Graphical User Interface for Sequence Alignment and Phylogenetic Tree Building. *Mol Biol Evol.* 2010; 27:221–224.
- Grayston SJ, Campbell CD. Functional biodiversity of microbial communities in the rhizospheres of hybrid larch (*Larix eurolepis*) and Sitka spruce (*Picea sitchensis*). *Tree Physiol.* 1996;16:1031-1038.
- Hinsinger P, Plassard C, Tang C, Jaillard B. Origins of root-mediated pH changes in the rhizosphere and their responses to environmental constraints: A review. *Plant Soil* 2003; 248:43–59.
- Jolivet C, Angers DA, Chantigny MH, Andreux F, Arrouays D. Carbohydrate dynamics in particle-size fractions of sandy spodosols following forest conversion to maize cropping. *Soil Biology and Biochemistry.* 2006; 38:2834-2842.
- Jongmans AG, van Breemen N, Lundström U, van Hees PAW, *et al.* Rock-eating fungi. *Nature* 1997; 389:682–683.
- Kawai S, Goda-Tsutsumi M, Yakushi T, Kano K, *et al.* Heterologous overexpression and characterization of a flavoprotein-cytochrome c complex fructose dehydrogenase of *Gluconobacter japonicus* NBRC3260. *Appl Environ Microbiol.* 2013; 79:1654–1660.

- Kovacs N. Identification of *Pseudomonas pyocyanea* by the oxidase reaction. *Nature* 1956; 178:703–703.
- Kovach ME, Elzer PH, Steven Hill D, Robertson GT, *et al.* Four new derivatives of the broad-host-range cloning vector pBBR1MCS, carrying different antibiotic-resistance cassettes. *Gene* 1995; 166:175–176.
- Koele N, Turpault M-P, Hildebrand EE, Uroz S, *et al.* Interactions between mycorrhizal fungi and mycorrhizosphere bacteria during mineral weathering: Budget analysis and bacterial quantification. *Soil Biol Biochem.* 2009; 41:1935–1942.
- Kranz RG, Richard-Fogal C, Taylor J-S, Frawley ER. Cytochrome c biogenesis: mechanisms for covalent modifications and trafficking of heme and for heme-iron redox control. *Microbiol Mol Biol Rev.* 2009; 73:510–528.
- Landeweert R, Hoffland E, Finlay RD, Kuyper TW, *et al.* Linking plants to rocks: ectomycorrhizal fungi mobilize nutrients from minerals. *Trends Ecol Evol.* 2001; 16:248–254.
- Lepieux C, Turpault MP, Oger P, Frey-Klett P, Uroz S. 2012. Correlation of the abundance of betaproteobacteria on mineral surfaces with mineral weathering in forest soils. *Appl Environ Microbiol.* 2012; 78:7114-7119.
- Leveau JHJ, Uroz S, de Boer W. The bacterial genus *Collimonas* : mycophagy, weathering and other adaptive solutions to life in oligotrophic soil environments. *Environ Microbiol.* 2010; 12:281–292.
- Lidbury IDEA, Murphy ARJ, Scanlan DJ, Bending GD, *et al.* Comparative genomic, proteomic and exoproteomic analyses of three *Pseudomonas* strains reveals novel insights into the phosphorus scavenging capabilities of soil bacteria: Comparative genomic, proteomic and exoproteomic analyses of three *Pseudomonas* strains. *Environ Microbiol.* 2016;18:3535–3549.
- Liu ST, Lee LY, Tai CY, Hung CH, *et al.* Cloning of an *Erwinia herbicola* gene necessary for gluconic acid production and enhanced mineral phosphate solubilization in *Escherichia coli* HB101: nucleotide sequence and probable involvement in biosynthesis of the coenzyme pyrroloquinoline quinone. *J Bacteriol.* 1992;174:5814–5819.
- Martin, F., D. Canet, Marchal JP. *In vivo* abundance ¹³C NMR studies of the carbohydrate storage in ectomycorrhizal fungi. *Physiol Veg.* 1984; 22:733–743.
- Matsushita, K., Ameyama, M. [24] d-Glucose dehydrogenase from *Pseudomonas fluorescens*, membrane-bound. In *Methods in enzymology* (Vol. 89, pp. 149-154). 1982; Academic Press.

- Medeiros PM, Fernandes MF, Dick RP, Simoneit BR. Seasonal variations in sugar contents and microbial community in a ryegrass soil. *Chemosphere*. 2006; 65:832-839.
- Mela F, Fritsche K, de Boer W, van den Berg M *et al*. Comparative genomics of bacteria from the genus *Collimonas*: linking (dis)similarities in gene content to phenotypic variation and conservation. *Environ Microbiol Rep*. 2012; 4:424–432.
- Palmer T, Berks BC. The twin-arginine translocation (Tat) protein export pathway. *Nat Rev Microbiol*. 2012 10:483–496.
- Picard L, Oger, P, Turpault, M-P, Uroz, S. Draft genome of *Collimonas pratensis* strain PMB3(1), an effective mineral weathering and chitin hydrolyzing bacterial strain. *Microbial Genom. Res*. DOI: 10.1128/MRA.00601-20
- Pospiech AA versatile quick-prep of genomic DNA from Gram-positive bacteria. *Trends Genet* . 1995;11:217–218.
- Puente ME, Bashan Y, Li CY, Lebsky VK. Microbial populations and activities in the rhizoplane of rock-weathering desert plants. II. Growth promotion of cactus seedlings. *Plant Biol*. 2004; 6:643–649.
- Ranger J, Turpault M-P. Input–output nutrient budgets as a diagnostic tool for sustainable forest management. *For Ecol Manag*. 1999; 122:139–154.
- Rodríguez H, Fraga R. Phosphate solubilizing bacteria and their role in plant growth promotion. *Biotechnol Adv* . 1999; 17:319–339.
- Saichana I, Moonmangmee D, Adachi O, Matsushita K, *et al*. Screening of thermotolerant *Gluconobacter* strains for production of 5-Keto-D-gluconic acid and disruption of Flavin Adenine Dinucleotide-containing D-gluconate dehydrogenase. *Appl Environ Microbiol*. 2009; 75:4240–4247.
- Sasnow SS, Wei H, Aristilde L. Bypasses in intracellular glucose metabolism in iron-limited *Pseudomonas putida*. *MicrobiologyOpen* 2016; 5:3–20.
- Shiota M, Yamazaki T, Yoshimatsu K, Kojima K, *et al*. An Fe–S cluster in the conserved Cys-rich region in the catalytic subunit of FAD-dependent dehydrogenase complexes. *Bioelectrochem*. 2016; 112:178–183.
- Sützl L, Foley G, Gillam EMJ, Bodén M, *et al*. The GMC superfamily of oxidoreductases revisited: analysis and evolution of fungal GMC oxidoreductases. *Biotechnol Biofuels* 2019; 12:1–18.
- Toyama H, Furuya N, Saichana I, Ano Y, *et al*. Membrane-bound, 2-keto-D-gluconate-yielding D-gluconate dehydrogenase from *Gluconobacter dioxyacetonicus* IFO 3271: molecular properties and gene disruption. *Appl Environ Microbiol*. 2007; 73:6551–6556.

- Toyama H, Soemphol W, Moonmangmee D, Adachi O, *et al.* Molecular properties of membrane-bound FAD-containing D-Sorbitol dehydrogenase from thermotolerant *Gluconobacter frateurii* isolated from Thailand. *Biosci Biotechnol Biochem.* 2005; 69:1120–1129.
- Turpault MP, Nys C, Calvaruso C. Rhizosphere impact on the dissolution of test minerals in a forest ecosystem. *Geoderma.* 2009; 153:147–154.
- Udovičić M, Sievers M, Zhang D-C, Margesin R, *et al.* *Glaciimonas alpina* sp. nov. isolated from alpine glaciers and reclassification of *Glaciimonas immobilis* Cr9-12 as the type strain of *Glaciimonas alpina* sp. nov. *Int J Syst Evol Microbiol.* 2015; 65:1779–1785.
- Uroz S, Calvaruso C, Turpault MP, Pierrat JC, *et al.* Effect of the mycorrhizosphere on the genotypic and metabolic diversity of the bacterial communities involved in mineral weathering in a forest soil. *Appl Environ Microbiol.* 2007;73:3019–3027.
- Uroz S, Calvaruso C, Turpault M-P, Frey-Klett P. Mineral weathering by bacteria: ecology, actors and mechanisms. *Trends Microbiol.* 2009; 17:378–387.
- Uroz S, Calvaruso C, Turpault M-P, Sarniguet A, *et al.* 2009b. Efficient mineral weathering is a distinctive functional trait of the bacterial genus *Collimonas*. *Soil Biol Biochem.* 2009; 41:2178–2186.
- Uroz S, Turpault M-P, Van Scholl L, Palin B, *et al.* Long term impact of mineral amendment on the distribution of the mineral weathering associated bacterial communities from the beech *Scleroderma citrinum* ectomycorrhizosphere. *Soil Biol Biochem.* 2011; 43:2275–2282.
- Uroz S, Picard L, Turpault M-P, Auer L, *et al.* Dual transcriptomic and proteomic analyses of the early stage of interaction between *Caballeronia mineralivorans* PML1(12) and mineral. In press. *Environmental Microbiol.* doi:10.1111/1462-2920.15159
- Vallenet D, Engelen S, Mornico D, Cruveiller S, MicroScope: a platform for microbial genome annotation and comparative genomics. Database 2009.
- Wagh J, Shah S, Bhandari P, Archana G, *et al.* Heterologous expression of pyrroloquinoline quinone (pqq) gene cluster confers mineral phosphate solubilization ability to *Herbaspirillum seropedicae* Z67. *Appl Microbiol Biotechnol.* 2014; 98:5117–5129.
- Wang Y-L, Sun L-J, Xian C-M, Kou F-L, *et al.* Interactions between biotite and the mineral-weathering bacterium *Pseudomonas azotoformans* F77. *Appl Environ Microbiol.* 2020 86:e02568-19.

- Yamaoka H, Yamashita Y, Ferri S, Sode K. Site directed mutagenesis studies of FAD-dependent glucose dehydrogenase catalytic subunit of *Burkholderia cepacia*. *Biotechnol Lett.* 2008; 30:1967–1972.
- Zámocký M, Hallberg M, Ludwig R, Divne C, *et al.* Ancestral gene fusion in cellobiose dehydrogenases reflects a specific evolution of GMC oxidoreductases in Fungi. *Gene* 2004; 338:1–14.
- Zhang, Z., Huang, J., He, L., Sheng, X. Distinct weathering ability and populations of culturable mineral-weathering bacteria in the rhizosphere and bulk soils of *Morus alba*. *Geomicrobiology J.* 2016; 33:39-45.

SUPPORTING INFORMATION

Table S1 : Description of the genomic region of the plasposon insertion in mutant 31(11B)

Accession number	Putative function	Gene annotation	Length (nt)		BLASTP (% Id against NCBI)	
NKI71669.1	Mg ²⁺ transporter protein, cora-like protein	_	1149	93%	Magnesium transporter cora family protein [WP_098495086.1]	<i>Collimonas sp.</i> PA-H2
NI*	Protein of unknown function	_	195	97%	Hypothetical protein cpter291_0433 [AMP12718.1]	<i>Collimonas pratensis</i>
NKI71670.1	Delta-aminolevulinic acid dehydratase	hemB	1068	99%	Porphobilinogen synthase [PFH10198.1]	<i>Collimonas sp.</i> PA-H2
NKI71671.1	Putative GTP-binding protein engB	engB	732	95%	Yiha family ribosome biogenesis GTP-binding protein [WP_098495089.1]	<i>Collimonas sp.</i> PA-H2
NKI71672.1	Cytochrome c4	_	666	99%	Cytochrome c4 [WP_098495090.1]	<i>Collimonas sp.</i> PA-H2
NKI71673.1	Cytochrome c-type biogenesis protein Ccs1/ResB	resB	2160	94%	Cytochrome c biogenesis protein resb [WP_098495091.1]	<i>Collimonas sp.</i> PA-H2
NKI71674.1	Cytochrome c-type biogenesis protein ccsa/resc	resC	1146	99%	C-type cytochrome biogenesis protein ccsb [WP_098497480.1]	<i>Collimonas sp.</i> PA-H2
NKI71675.1	Putative phosphatase yieh	_	684	92%	HAD family hydrolase [WP_098495092.1]	<i>Collimonas sp.</i> PA-H2
NKI71676.1	Exported heme-molybdoenzyme molybdopterin-containing subunit yedy; TAT export	yedY	981	94%	Protein-methionine-sulfoxide reductase catalytic subunit msrp [WP_098495093.1]	<i>Collimonas sp.</i> PA-H2
NKI71677.1	Sulfoxide reductase heme-binding subunit yedz	yedZ	669	89%	Sulfoxide reductase heme-binding subunit yedz [WP_098495094.1]	<i>Collimonas sp.</i> PA-H2
NKI71678.1	Conserved exported protein of unknown function	_	825	87%	Transporter [WP_092414082.1]	<i>Collimonas sp.</i> OK307

* Some of the proteins listed have not been identified (NI) according to the prediction tools used by NCBI, but were predicted in the MICROSCOPE platform.

Table S2 : Description of the genomic region of the plasposon insertion in mutant 34(11H)

Accession number	Putative function	Gene annotation	Length (nt)		BLASTP (%Id against NCBI)	
NKI71753.1	Imidazole glycerol phosphate synthase, catalytic subunit with hish	hisF	765	99%	Imidazole glycerol phosphate synthase subunit hisf [WP_092356093.1]	<i>Collimonas sp.</i> OK242
NKI71754.1	Fragment of bifunctional protein [Includes: phosphoribosyl-AMP cyclohydrolase; phosphoribosyl-ATP pyrophosphatase] (part 1)	hisIE	396	97%	Phosphoribosyl-AMP cyclohydrolase [WP_092434873.1]	<i>Collimonas sp.</i> OK607
NKI71755.1	Fragment of bifunctional protein [Includes: phosphoribosyl-AMP cyclohydrolase; phosphoribosyl-ATP pyrophosphatase] (part 2)	hisIE	378	94%	Phosphoribosyl-ATP diphosphatase [WP_098495230.1]	<i>Collimonas sp.</i> PA-H2
NKI71756.1	Protein hita	hitA	372	93%	Histidine triad nucleotide-binding protein [WP_098495231.1]	<i>Collimonas sp.</i> PA-H2
NKI71757.1	Sec-independent protein translocase protein tata	tatA	231	95%	Twin-arginine translocation protein tata [AEK60361.1]	<i>Collimonas fungivorans</i> Ter331
NKI71758.1	Sec-independent protein translocase protein tatb	tatB	495	93%	Sec-independent protein translocase subunit tatb [WP_098495232.1]	<i>Collimonas sp.</i> PA-H2
NKI71759.1	Tatabce protein translocation system subunit	tatC	768	95%	Twin-arginine translocase subunit tate [WP_098495233.1]	<i>Collimonas sp.</i> PA-H2
NKI71760.1	Conserved protein of unknown function	—	690	97%	DUF2461 domain-containing protein [WP_098495234.1]	<i>Collimonas sp.</i> PA-H2
NKI71761.1	Emrb/qaca subfamily drug resistance transporter	—	1452	94%	DHA2 family efflux MFS transporter permease subunit [WP_098495235.1]	<i>Collimonas sp.</i> PA-H2
NKI71762.1	Putative htra-like serine protease	—	1167	98%	Do family serine endopeptidase [WP_098495236.1]	<i>Collimonas sp.</i> PA-H2
NKI71763.1	Putative GTP cyclohydrolase 1 type 2	—	768	93%	Dinuclear metal center ybgi/SA1388 family protein [PFH10368.1]	<i>Collimonas sp.</i> PA-H2

NKI71764.1	Heat shock protein 15 homolog	hslR	387	96%	RNA-binding S4 domain-containing protein [WP_098495238.1]	<i>Collimonas sp.</i> PA-H2
------------	-------------------------------	------	-----	-----	--------------------------------------------------------------	--------------------------------

Table S3 : Description of the genomic region of the plasposon insertion in mutant 59(7B)

Accession number	Putative function	Gene annotation	Length (nt)	Blastp (%id against ncbi)	
NKI72634.1	Zinc metalloprotease	_	984	93%	Hypothetical protein BCF11_1207 [PFH08832.1] <i>Collimonas sp. PA-H2</i>
NKI72635.1	1-acyl-sn-glycerol-3-phosphate acyltransferase	nlaB	744	98%	1-acyl-sn-glycerol-3-phosphate acyltransferase [WP_098493940.1] <i>Collimonas sp. PA-H2</i>
NKI72636.1	D-glycero-beta-D-manno-heptose-1,7-bisphosphate 7-phosphatase	_	558	97%	D-glycero-beta-D-manno-heptose 1,7-bisphosphate 7-phosphatase [WP_098493939.1] <i>Collimonas sp. PA-H2</i>
NKI72637.1	Glycine trna synthetase, beta subunit	glyS	2133	96%	Glycine--trna ligase subunit beta [WP_098493938.1] <i>Collimonas sp. PA-H2</i>
NKI72638.1	Glycyl-trna synthetase, alpha chain	glyQ	981	99%	Glycine--trna ligase subunit alpha [WP_098493937.1] <i>Collimonas sp. PA-H2</i>
NKI72639.1	Apolipoprotein N-acyltransferase	Int	1554	92 %	Apolipoprotein N-acyltransferase [WP_098493936.1] <i>Collimonas sp. PA-H2</i>
NKI72640.1	Putative protein involved in divalent ion export	ybeX	882	99%	CBS domain-containing protein [WP_098493935.1] <i>Collimonas sp. PA-H2</i>
NKI72641.1	Conserved exported protein of unknown function	_	267	83%	Pentapeptide MXKDX repeat protein [WP_098497346.1] <i>Collimonas sp. PA-H2</i>
NKI72642.1	Oxidoreductase, molybdopterin binding protein	_	780	97%	Molybdopterin-dependent oxidoreductase [WP_098493934.1] <i>Collimonas sp. PA-H2</i>
NKI72643.1	Thiosulfate reductase cytochrome B subunit (Membrane anchoring protein)	_	615	94%	Cytochrome b/b6 domain-containing protein [WP_098493933.1] <i>Collimonas sp. PA-H2</i>
NI*	Protein of unknown function	_	114	97%	Hypothetical protein cpter91_4422 [AMP06731.1] <i>Collimonas pratensis</i>

* Some of the proteins listed have not been identified (NI) according to the prediction tools

used by NCBI, but were predicted in the MICROSCOPE platform.

Table S4: List of proteins carrying a TAT-signal in the strain *Collimonas pratensis* PMB3(1)

The COG class of each protein is indicated with one-letter abbreviation as followed: P, inorganic ion transport and metabolism; Q, secondary metabolites biosynthesis, transport and catabolism; C, energy production and conversion; E, amino acid metabolism and transport; F, nucleotide metabolism and transport; G, carbohydrate metabolism and transport; H, coenzyme and metabolism; J, translation, ribosomal structure and biogenesis; K, transcription; L, replication, recombination and repair; M, cell wall, membrane, envelope biogenesis; N, cell motility; O, posttranslational modification, protein turnover, chaperones; S, function unknown; U, intracellular trafficking, secretion, and vesicular transport; W, extracellular structures. The bold rows indicated the proteins mentioned in the text and could be involved in MW. Some of the proteins listed have not been identified (NI) according to the prediction tools used by NCBI, but were predicted in the MICROSCOPE platform.

Accession number (MAGE)	Gene annotation	Putative function	COG class
NKI68675.1	<i>yagR</i>	Aerobic-type carbon monoxide dehydrogenase, large subunit	C
NKI69300.1	<i>iorB</i>	Isoquinoline 1-oxidoreductase beta subunit	C
NKI69617.1	<i>soxH</i>	putative cytochrome C oxidase polypeptide II oxidoreductase protein	C
NKI71676.1	<i>yedY</i>	exported heme-molybdoenzyme molybdopterin-containing subunit YedY; TAT export	C
NKI72252.1	<i>mgo</i>	malate dehydrogenase, FAD	C
NKI72324.1	<i>FAD</i>	FMN-dependent dehydrogenase	C
NKI67910.1		exported protein of unknown function	C
NKI69616.1		conserved protein of unknown function	C
NKI68636.1		putative branched-chain amino acid transport protein (ABC superfamily, peri_bind)	E
NKI68806.1		ABC transporter substrate-binding protein	E
NKI69719.1	<i>aguA</i>	putative agmatine deiminase	E
NKI69739.1	<i>ggtA</i>	Gamma-glutamyltranspeptidase	E
NKI72278.1		Monoamine oxidase	E
NKI71314.1		conserved protein of unknown function	E
NKI68557.1	<i>rihA</i>	Pyrimidine-specific ribonucleoside hydrolase RihA	F
NKI71053.1		putative nucleoside hydrolase	F
NKI67981.1	<i>ykgB</i>	putative hemagglutinin-like protein	G
NKI68770.1	<i>bga</i>	Beta-galactosidase	G
NKI69257.1	<i>ytfQ</i>	putative sugar transporter subunit: periplasmic-binding component of ABC superfamily	G
NKI68420.1		conserved membrane protein of unknown function	G
NKI69773.1		conserved exported protein of unknown function	G
NKI72549.1		conserved exported protein of unknown function	H
NKI71161.1		Amidase, Asp-tRNAAsn/Glu-tRNAGln amidotransferase A subunit	J
NKI71645.1	<i>rplP</i>	50S ribosomal protein L16	J
	NI	protein of unknown function	J
NKI68641.1		LysR family transcriptional regulator	K
NKI72806.1		transposase	L
NKI68262.1	<i>plcN</i>	Non-hemolytic phospholipase C	M
NKI68666.1	<i>mrcA</i>	Penicillin-binding protein 1A	M

NKI69363.1	<i>acpA</i>	Acid phosphatase	M
NKI69405.1	<i>plcN</i>	Non-hemolytic phospholipase C	M
NKI71095.1	<i>plcN</i>	Non-hemolytic phospholipase C	M
NKI72507.1	<i>amiC</i>	N-acetylmuramoyl-L-alanine amidase	M
NKI68496.1		putative Peptide-N(4)-(N-acetyl-beta-glucosaminy)asparagine amidase	N
NKI69248.1	<i>ppiA</i>	peptidyl-prolyl cis-trans isomerase A (rotamase A)	O
NKI69912.1	<i>msrB</i>	Methionine sulfoxide reductase	O
NKI72023.1		CcsA-like protein	O
NKI72219.1	<i>lifO</i>	Lipase chaperone	O
NKI72562.1		Methionine-R-sulfoxide reductase	O
NKI70121.1	<i>mdoD</i>	glucan biosynthesis protein, periplasmic	P
NKI71510.1	<i>phoD</i>	Alkaline phosphatase	P
NKI72113.1	<i>nasF</i>	Nitrate ABC transporter, nitrate-binding protein	P
NKI72201.1		ABC-type nitrate/sulfonate	P
NKI72274.1	<i>Nitrate</i>	sulfonate	P
NKI72605.1		Alkaline phosphatase	P
NKI72716.1	<i>metQ</i>	DL-methionine transporter subunit ; periplasmic-binding component of ABC superfamily	P
NKI67804.1	<i>ysgA</i>	putative hydrolase	Q
NKI68502.1		putative multicopper oxidase	Q
NI		protein of unknown function	Q
NKI71458.1		conserved exported protein of unknown function	Q
NKI72652.1		Type 4 fimbrial biogenesis protein PilY1	U
NKI72179.1		exported protein of unknown function	U
NKI70646.1		YadA-like protein	W
NKI68516.1	<i>ars</i>	Hydrolase	S
NKI68701.1		putative transmembrane protein	S
NKI68877.1		Sulfite dehydrogenase (Cytochrome) subunit SorA apoprotein	S
NKI69325.1	<i>yvnB</i>	LPXTG-motif cell wall anchor domain protein	S
NKI70794.1	<i>gdhS</i>	Sorbitol/Glucose/2-Keto-D-gluconate dehydrogenase, membrane-bound, gamma subunit	S
NKI71018.1		Phosphoserine phosphatase	S
NKI71108.1		putative secreted protein	S
NKI71438.1		Lipoprotein	S
NKI71603.1	<i>ophA</i>	ABC peptide	S
NKI68405.1		conserved exported protein of unknown function	S
NKI68510.1		conserved exported protein of unknown function	S
NKI68544.1		conserved protein of unknown function	S
NKI68550.1		protein of unknown function	S
NKI69712.1		conserved protein of unknown function	S
NKI70227.1		conserved protein of unknown function	S
NKI71034.1		conserved exported protein of unknown function	S
NKI71518.1		conserved exported protein of unknown function	S
NKI71778.1		exported protein of unknown function	S
NKI71790.1		conserved exported protein of unknown function	S
NI		protein of unknown function	S
NI		protein of unknown function	S

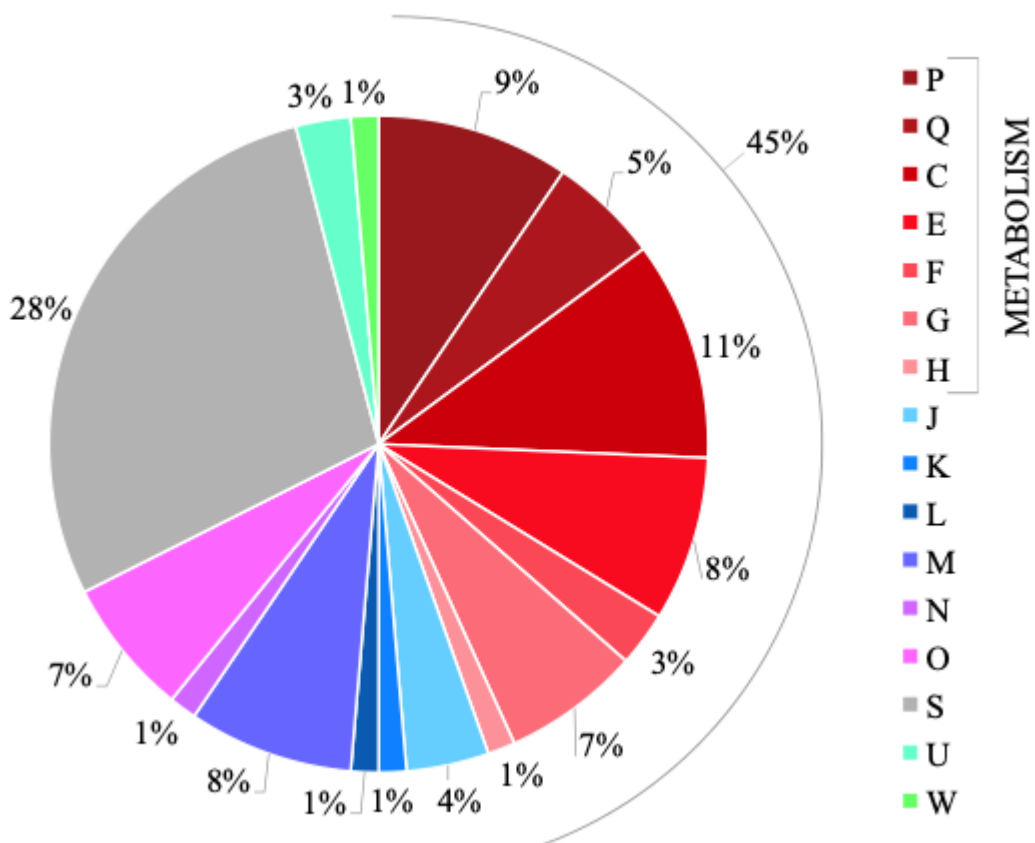


Figure S1 : COG class distribution of the TAT-proteins

The proteins highlighted in red colors light to dark are those involved in metabolism, which encompass *ca.* 45 % of the total TAT-proteins.

```

Domain 1 FAD      1 -----TVGSGVAGALVAHQLAS SGASVLVLEAGPRIK-----
Col_PMB31        1 MA--D--N-----LSADVIVGSGVAGALVAHQLAS SGASVLVLEAGPRLERWRIVENY
Col.prat_Ter291  1 MA--D--N-----LSADVIVGSGVAGALVAHQLAS SGASVLVLEAGPRLERWRIVENY
Col.prat_Ter91   1 MA--D--N-----LSADVIVGSGVAGALVAHQLAS SGASVLVLEAGPRLERWRIVENY
Col.arenae_Cal35 1 MA--D--N-----LSADVIVGSGVAGALVAHQLAS SGASVLVLEAGPRLERWRIVENY
Col.sp_PA-H2     1 MA--D--N-----LSADVIVGSGVAGALVAHQLAS SGASVLVLEAGPRLERWRIVENY
Col.fungi_Ter6   1 MA--D--N-----LSADVIVGSGVAGALVAHQLAS SGASVLVLEAGPRLERWRIVENY
Col.fungi_Ter331 1 MA--D--N-----LSADVIVGSGVAGALVAHQLAS SGASVLVLEAGPRLERWRIVENY
Col.arenae_Ter282 1 MA--D--N-----LSADVIVGSGVAGALVAHQLAS SGASVLVLEAGPRLERWRIVENY
Col.arenae_Ter10 1 MA--D--N-----LSADVIVGSGVAGALVAHQLAS SGASVLVLEAGPRLERWRIVENY
Col.sp_OK307     1 MA--D--N-----LSADVIVGSGVAGALVAHQLAS SGASVLVLEAGPRLERWRIVENY
Col.sp_OK607     1 MA--D--N-----LSADVIVGSGVAGALVAHQLAS SGASVLVLEAGPRLERWRIVENY
Col.sp_OK242     1 MA--D--N-----LSADVIVGSGVAGALVAHQLAS SGASVLVLEAGPRLERWRIVENY
Glacii_sp_PCH181 1 MA--D--N-----LSADVIVGSGVAGALVAHQLAS SGASVLVLEAGPRLERWRIVENY
Glacii_sp_GS1    1 MA--D--N-----LSADVIVGSGVAGALVAHQLAS SGASVLVLEAGPRLERWRIVENY
Janthin_UBA1134 1 MN--D--T-----LSADVIVGSGVAGALVAHQLAS SGASVLVLEAGPRLERWRIVENY
Herba_seropedic  1 MS--N--P-----NSADVIVGAGVTCALLATRLAKGKSVLLESGPRMGRDQIVERT
Herba_rubrisuba  1 MS--N--V-----NSADVIVGAGVTCALLATRLARSGKSVLLESGPRMGRDQIVERT
Burkholderia     1 MA--D--TDT-----QKADVIVGSGVAGALVAHQLAMAGKAVILLEAGPRMWRWEIVERT
Gluc_japonicus   1 MS--N--ET-----LSADVIVGAGVTCALLATRLAKGKSVLLESGPRMGRDQIVERT
Pantoea_agglo.   1 MKKP---VFTAQGDASADIVIVGSGVAGALVAHQLAS SGASVLVLEAGPRLERWRIVENY
Gluc_oxydans     1 MSSSN--S-----LSADVIVGSGVAGASTANELARAGLSVIVLEAGPRIDRQHIENF
Glucon_frateuri  1 MSSSN--S-----FSADVIVGSGVAGASTANELARAGLSVIVLEAGPRIDRQHIENF
Glucon_fra (GADH) 1 -M--T--K-----KHVDAIVVAGAGVAGSILAKELTEAGLSVVMLEKRS--ERATAVEGA
    
```

```

domain
Col_PMB31        51 RNTP--S--KDDFMYPYPSTKYAPHP--EYTP--ENNYLILKGTH--KYNSQY--I--RAVGGT
Col.prat_Ter291  51 RNTP--S--KDDFMYPYPSTKYAPHP--EYTP--ENNYLILKGTH--KYNSQY--I--RAVGGT
C.pratensis_Ter  51 RNTP--S--KDDFMYPYPSTKYAPHP--EYTP--ENNYLILKGTH--KYNSQY--I--RAVGGT
C.arenae_Cal35   51 RNTP--S--KDDFMYPYPSTKYAPHP--EYTP--ENNYLILKGTH--KYNSQY--I--RAVGGT
Collimonas_sp_P  51 RNTP--S--KDDFMYPYPSTKYAPHP--EYTP--ENNYLILKGTH--KYNSQY--I--RAVGGT
C.fungivorans_T  51 RNTP--S--KDDFMYPYPSTKYAPHP--EYTP--ENNYLILKGSH--KYNSQY--I--RAVGGT
C.fungivorans_T  51 RNTP--S--KDDFMYPYPSTKYAPHP--EYTP--ENNYLILKGSH--KYNSQY--I--RAVGGT
C.arenae_Ter282  51 RNTP--S--KDDFMYPYPSTKYAPHP--EYTP--ENNYLILKGTH--KYNSQY--I--RAVGGT
C.arenae_Ter10   51 RNTP--S--KDDFMYPYPSTKYAPHP--EYTP--ENNYLILKGTH--KYNSQY--I--RAVGGT
Collimonas_sp_0  51 RNTP--S--KDDFMYPYPSTKYAPHP--EYTP--ENNYLILKGTH--KYNSQY--I--RAVGGT
Collimonas_sp_0  51 RNTP--S--KDDFMYPYPSTKYAPHP--EYTP--ENNYLILKGTH--KYNSQY--I--RAVGGT
Collimonas_sp_0  51 RNTP--S--KDDFMYPYPSTKYAPHP--EYTP--ENNYLILKGTH--KYNSQY--I--RAVGGT
Glaciimonas_sp_  51 RNTA--S--KDDFMTPYPSTKHPHP--EYTP--ENNYLILKGSQ--KYNSQY--I--RAVGGT
Glaciimonas_sp_  51 RNTP--S--KDDFMTPYPSTKYAPHP--EYTP--ENNYLILKGEH--KYNSQY--I--RAVGGT
Janthin_UBA1134  51 RNTP--A--KDDFMYPYPSTRHAPHP--QYTP--ENNYLILKGTGTH--KYNSQY--I--RAVGGT
Herba_seropedic  51 RSSAF----KSDFMAPYPYSPLAPHP--RYTPEPNGYLQOKGPH--AFNAQY--I--RMFGGT
Herba_rubrisuba  51 RSSAF----KSDFMAPYPYSPLAPHP--RYTPEPNGYLQOKGPH--AFNAQY--I--RMFGGT
AAN39686.1Burkh  53 RNQP--D--KMDFMAPYPSSPWAPHP--EYGP--PNLYLILKGEH--KYNSQY--I--RAVGGT
BAM93252.1Gluco  52 RNMPDNKSQYDYPATPYPSPVWAPHT--NYFP--DNNYLILKGPDRTAKQGI--I--KGVGGT
AAF21261.1Panto  58 RNMPFANRAGSDFQGLYFQSKFAPAP--LYFP--RNNYLILKGPDRTAKQGI--I--KGVGGT
AFW02570.1Gluco  53 RTTEN----KGAYQLPYPFPVWAMHP--PDQGS PNGYLHTTGPDGAAYQGY--L--RVVGGT
BAD60913.1       53 RTTEN----KGAYQLPYPFPVWAMHP--PDQGS PNGYLHTTGPDGAAYQGY--L--RVVGGT
Glucon_frateuri  48 YPESI----D--ELRGAIRKRLFQNLSTVTVRNTIDQTALPY--BQLAA--LPGEVGGGA
    
```

```

domain
-----
Col_PMB31      101 TWHWAAAAWRFLPNDFR MKTLYGV ----- GRDWPISYDELEPYYYRAEVELGV
Col.prat_Ter291 101 TWHWAAAAWRFLPNDFR MKTLYGV ----- GRDWPISYDELEPYYYRAEVELGV
C.pratensis_Ter 101 TWHWAAAAWRFLPNDFR MKTLYGV ----- GRDWPISYDELEPYYYRAEVELGV
C.arenae_Cal35  101 TWHWAAAAWRFLPNDFR MKTLYGV ----- GRDWPISYDELEPYYYRAEVELGV
Collimonas_sp_P 101 TWHWAAAAWRFLPNDFR MKTLYGV ----- GRDWPISYDELEPYYYRAEVELGV
C.fungivorans_T 101 TWHWAAAAWRFLPNDFR MKTLYGV ----- GRDWPISYDELEPYYYRAEVELGV
C.fungivorans_T 101 TWHWAAAAWRFLPNDFR MKTLYGV ----- GRDWPISYDELEPYYYRAEVELGV
C.arenae_Ter282 101 TWHWAAAAWRFLPNDFR MKTLYGV ----- GRDWPISYDELEPYYYRAEVELGV
C.arenae_Ter10  101 TWHWAAAAWRFLPNDFR MKTLYGV ----- GRDWPISYDELEPYYYRAEVELGV
Collimonas_sp_O 101 TWHWAAAAWRFLPNDFR MKTLYGV ----- GRDWPISYDELEPYYYRAEVELGV
Collimonas_sp_O 101 TWHWAAAAWRFLPNDFR MKTLYGV ----- GRDWPISYDELEPYYYRAEVELGV
Collimonas_sp_O 101 TWHWAAAAWRFLPNDFR MKTLYGV ----- GRDWPICGYDELEPYYYRAEVELGV
Glaciimonas_sp_ 101 TWHWAAAAWRFLPNDFR MKTLYGV ----- GRDWPISYDELEPYYYRAEVELGV
Glaciimonas_sp_ 101 TWHWAAAAWRFLPNDFR MKTLYGV ----- GRDWPINIDELEPYYYRAEVELGV
Janthin_UBA1134 101 TWHWAASTWRLLPNDFR MRSRYGV ----- GRDWPILAYEDLEASYYRAEELGV
Herba_seropedic 102 SWHWAAQLWRYVPNDFR QHSLYGV ----- GRDWPISYDDLEDYYYQAEVIAGV
Herba_rubrisuba 102 SWHWAAQLWRYVPNDFR QHSLYGV ----- GRDWPISYDDLEDYYYQAEVIAGV
AAN39686.1Burkh 103 TWHWAAASAWRFLPNDFR MKSVYGV ----- GRDWPIDYDDLEPYQRAEELGV
BAM93252.1GlucO 108 TWHWAAASSWRYLPNDFR LKHSYGV ----- GRDWAAMSDELEPYYYEAECEMGV
AAF21261.1Panto 114 TWHWAAASCWRHHPSEDFR MQSKYGV ----- GRDWPICGYDELEPYCKKAENEIGV
AFW02570.1GlucO 106 TWHWAAACAWRYLPSDFR LHSRYGV ----- GRDWAIAKYDDLEPYYYQAEVMMGV
BAD60913.1      106 TWHWAAACAWRYLPSDFR LHSRYGV ----- GRDWAIAKYDDLEPYYYQAEVMMGV
Glucon_frateuri 101 GLHWSGVHFRVSPEDLR LRSVVERYGEKFIPEGMNLQDMGVTYSELEPFDDKAEKVEFGT

```

```

domain
-----
Col_PMB31      149 SGPND-----GTDLGSPRKQPYMDHLPLSWNDQRFSAVVNAN-G--HKVVSEPVA
Col.prat_Ter291 149 SGPND-----GTDLGSPRKQPYMDHLPLSWNDQRFSAVVNAN-G--HKVVSEPVA
C.pratensis_Ter 149 SGPND-----GTDLGSPRKQPYMDHLPLSWNDQRFSAVVNAN-G--HKVVSEPVA
C.arenae_Cal35  149 SGPND-----GTDLGSPRKQPYMDHLPLSWNDQRFSAVVNAN-G--HKVVSEPVA
Collimonas_sp_P 149 SGPND-----GTDLGSPRKQPYMDHLPLSWNDQRFSAVVNAN-G--HKVVSEPVA
C.fungivorans_T 149 SGPND-----GTDLGSPRKQPYMDHLPLSWNDQRFSAVVNAN-G--HKVVSEPVA
C.fungivorans_T 149 SGPND-----GTDLGSPRKQPYMDHLPLSWNDQRFSAVVNAN-G--HKVVSEPVA
C.arenae_Ter282 149 SGPND-----GTDLGSPRKQPYMDHLPLSWNDQRFSAVVNAN-G--HKVVSEPVA
C.arenae_Ter10  149 SGPND-----GTDLGSPRKQPYMDHLPLSWNDQRFSAVVNAN-G--HKVVSEPVA
Collimonas_sp_O 149 SGPND-----GTDLGSPRKQPYMDHLPLSWNDQRFSAVVNAN-G--HKVVSEPVA
Collimonas_sp_O 149 SGPND-----GTDLGSPRKQPYMDHLPLSWNDQRFSAVVNAN-G--HKVVSEPVA
Collimonas_sp_O 149 SGPND-----GTDLGSPRKQPYMDHLPLSWNDQRFSAVVNAN-G--HKVVSEPVA
Glaciimonas_sp_ 149 SGPND-----GTDLGSPRKQPYMDHLPLSWNDQRFSAVVNAN-G--HKVVSEPVA
Glaciimonas_sp_ 149 SGPND-----GTDLGSPRKQPYMDHLPLSWNDQRFSAVVNAN-G--HKVVSEPVA
Janthin_UBA1134 149 SGPND-----GTDLGSPRKQPYMDHLPLSWNDQRFSAVVNAN-G--HKVVSEPVA
Herba_seropedic 150 GGSPE-----S---GSPRKHPTMFRVFPASWLRVTLARIAPAE-F---TVLDDSTG
Herba_rubrisuba 150 GGSPE-----S---GSPRKHPTMFRVFPASWLRVTLARIAPAE-F---TVLDDSTG
AAN39686.1Burkh 151 WPGP-P-----EEDLYSPRKQPYMPPLPLSINQTIKTAANNY-DPKFHVVEPVA
BAM93252.1GlucO 156 MGPNGE-----EITPSAPRQNPMPMTSMFYGYGDRTFTEIVSKL-G--FSNTPVPEQA
AAF21261.1Panto 162 AGPND-----PDRQSPTEERSQPYMDMVPFAHGDNVYFASVVNPH-G--YNIIVPIPEQA
AFW02570.1GlucO 154 AGPND-----DVDLDGSPRSHDYPMKEVPLSYGADQFRKLIHEKTN--YRVVHEPEQA
BAD60913.1      154 AGPND-----DVDLDGSPRSHDYPMKEVPLSYGADQFRKLIHEKTN--YRVVHEPEQA
Glucon_frateuri 161 SGEAYKVNKGIVGNINIFDGDSDNIPLPAMKDTETASTERAAATEAG---YHPYSLPAA

```

Domain 2 GMC_N

```

-----CCGNNNCMPICP-----AEKAGARVLPDAVV
Col_PMB31      197 RNSRAYDERPNCCCGNNNCMPICPIAAM-----YSGIIHVEKAEKAGARVLPDAVV
Col.prat_Ter291 197 RNSRAYDERPNCCCGNNNCMPICPIAAM-----YSGIIHVEKAEKAGARVLPDAVV
C.pratensis_Ter 197 RNSRAYDERPNCCCGNNNCMPICPIAAM-----YSGIIHVEKAEKAGARVLPDAVV
C.arenae_Cal35  197 RNSRAYDERPNCCCGNNNCMPICPIAAM-----YSGIIHVEKAEKAGAKVLPDAVV
Collimonas_sp_P 197 RNSRAYDERPNCCCGNNNCMPICPIAAM-----YSGIIHVEKAEKAGARVLPDAVV
C.fungivorans_T 197 RNSRAYDERPNCCCGNNNCMPICPIAAM-----YSGIIHVEKAEKAGAKVLPDAVV
C.fungivorans_T 197 RNSRAYDERPNCCCGNNNCMPICPIAAM-----YSGIIHVEKAEKAGAKVLPDAVV
C.arenae_Ter282 197 RNSRAYDQRPNCCCGNNNCMPICPIAAM-----YSGIIHVEKAEKAGAKVLPDAVV
C.arenae_Ter10  197 RNSRAYDQRPNCCCGNNNCMPICPIAAM-----YSGIIHVEKAEKAGAKVLPDAVV
Collimonas_sp_O 197 RNSRAYDQRPNCCCGNNNCMPICPIAAM-----YSGIIHVEKAEKAGAKVLPDAVV
Collimonas_sp_O 197 RNSRAYDQRPNCCCGNNNCMPICPIAAM-----YSGIIHVEKAEKAGAKVLPDAVV
Collimonas_sp_O 197 RNSRAYDQRPNCCCGNNNCMPICPIAAM-----YSGIIHVEKAEKAGARVLPDAVV
Glaciimonas_sp_ 197 RNSRAYDARPNCCGNNNCMPICPIAAM-----YSGIIHVEKAEKAGAKVLPDAVV
Glaciimonas_sp_ 197 RNSRAYDERPNCCCGNNNCMPICPIAAM-----YSGIIHVEKAEKAGAKVLPDAVV
Janthin_UBA1134 197 RNSRAYDARPNCCGNNNCMPICPIAAM-----YGGIVHVEKAEKAGARVLANAVV
Herba_seropedic 194 RNSRNYDGRPACCGNNNCMPICPIAAM-----YHGGIAAQQAEDSGVQVITPAVV
Herba_rubrisuba 194 RNSRNYDGRPACCGNNNCMPICPIAAM-----YHGGIAAQQAEDSGVQVITPAVV
AAN39686.1Burkh 201 RNSRPYDGRPTCCGNNNCMPICPIAAM-----YNGIVHVEKAEKAGAKVLANAVV
BAM93252.1GlucO 205 RNSRPYDGRPTCCGNNNCMPICPIAAM-----YNGVYAAIKAEKLGAKVLANAVV
AAF21261.1Panto 211 RSTRPWEGRPTCCGNNNCMPICPIAAM-----YNGIHHVEKAEKAGARVLANAVV
AFW02570.1GlucO 204 RNTRPYDKRPTCCGNNNCMPICPIAAM-----YNGIHSVNHAEKAGARVLANAVV
BAD60913.1      204 RNTRPYDKRPTCCGNNNCMPICPIAAM-----YNGIHSVNHAEKAGARVLANAVV
Glucon_frateuri 218 NASROYTN-PYGCQMGFCN-FCGYCSGYDCYLYSKASPNVNLPALRQDEGFTLISDAHV

```

Domain 2 GMC_N

```

YRIEVDAK-E-RISAVHYKDPDGAS-HRVTGKYFVLAANGIEIPKLMLSTDDKHKNGVG
Col_PMB31      247 YRIEVDAK-E-RISAVHYKDPDGAS-HRVTGKYFVLAANGIEIPKLMLSTDDKHKNGVG
Col.prat_Ter291 247 YRIEVDAK-E-RISAVHYKDPDGAS-HRVTGKYFVLAANGIEIPKLMLSTDDKHKNGVG
C.pratensis_Ter 247 YRIEVDAK-E-RISAVHYKDPDGAS-HRVTGKYFVLAANGIEIPKLMLSTDDKHKNGVG
C.arenae_Cal35  247 YRIEVDAK-E-RISAVHYKDPDGAS-HRVTGKYFVLAANGIEIPKLMLSTDDKHKNGVG
Collimonas_sp_P 247 YRIEVDAK-E-RISAVHYKDPDGAS-HRVTGKYFVLAANGIEIPKLMLSTDDKHKNGVG
C.fungivorans_T 247 YRIEVDAK-E-RISAVHYKDPDGAS-HRVTGKYFVLAANGIEIPKLMLSTDDKHKNGVG
C.fungivorans_T 247 YRIEVDAK-E-RISAVHYKDPDGAS-HRVTGKYFVLAANGIEIPKLMLSTDDKHKNGVG
C.arenae_Ter282 247 YRIEVDAK-E-RISAVHYKDPDGAS-HRVTGKYFVLAANGIEIPKLMLSTDDKHKNGVG
C.arenae_Ter10  247 YRIEVDAK-E-RISAVHYKDPDGAS-HRVTGKYFVLAANGIEIPKLMLSTDDKHKNGVG
Collimonas_sp_O 247 YRIEVDAK-E-RISAVHYKDPDGAS-HRVTGKYFVLAANGIEIPKLMLSTDDKHKNGVG
Collimonas_sp_O 247 YRIEVDAK-E-RISAVHYKDPDGAS-HRVTGKYFVLAANGIEIPKLMLSTDDKHKNGVG
Collimonas_sp_O 247 YRIEVDAK-E-RISAVHYKDPDGAS-HRVTGKYFVLAANGIEIPKLMLSTDDKHKNGVG
Collimonas_sp_O 247 YRIEVDAK-E-RISAVHYKDPDGAS-HRVTGKYFVLAANGIEIPKLMLSTDDKHKNGVG
Glaciimonas_sp_ 247 YRIEVDAK-E-RISAVHYKDPDGAS-HRVTGKYFVLAANGIEIPKLMLSTDDKHKNGVG
Glaciimonas_sp_ 247 YRIEVDAK-E-RISAVHYKDPDGAS-HRVTGKYFVLAANGIEIPKLMLSTDDKHKNGVG
Janthin_UBA1134 247 YRIEADDK-G-RIAVHYKDPDGNS-HRVTGKRFVLAANGIEIPKLMLSSSARQPNGV
Herba_seropedic 244 YRIEHDDK-G-RIAVHYKDPDGNS-HRVTGKRFVLAANGIEIPKLMLSSVSDKFPGI
Herba_rubrisuba 244 YRIEHDDK-G-RIAVHYKDPDGNS-HRVTGKRFVLAANGIEIPKLMLSSVSDKFPGI
AAN39686.1Burkh 251 YKIETGPD-K-RIVAALYKDKTGAE-HRVEGKYFVLAANGIEIPKLMLSSANRDFPNGV
BAM93252.1GlucO 255 YAMETDAK-N-RITALSHYDPDKQS-HRVVAKTFVLAANGIEIPKLMLSSAANDRNPHGIA
AAF21261.1Panto 261 YKMDTDSN-N-RITAVHLDTSGAS-HRATAKAFALACNGIETPKLLSSAANDANPNGIA
AFW02570.1GlucO 254 YRIETDAS-NKKVVAVNYDPDKNS-HRVTGKFFVAAHCIESAKLLLSSADDKNPRGIA
BAD60913.1      254 YRIETDAS-NKKVVAVNYDPDKNS-HRVTGKFFVAAHCIESAKLLLSSADDKNPRGIA
Glucon_frateuri 276 LRVDIETRS-KATGVTYLETKTQKEVS-AADLVLSAFQFHNVHLMLLSSIGIK-PYDPV

```

Domain 2 GMC_N

```

Col_PMB31      304  NSSDQVGRNLMDHPTGVTFLA---N-EDLWPGRGPIEMTSMVDMRDGAFRSEYAACKLH
Col.prat_Ter291 304  NSSDQVGRNLMDHPTGVTFLA---N-EDLWPGRGPIEMTSMVDMRDGAFRSEYAACKLH
C.pratensis_Ter 304  NSSDQVGRNLMDHPTGVTFLA---N-EDLWPGRGPIEMTSMVDMRDGAFRSEYAACKLH
C.arenae_Cal35  304  NSSDQVGRNLMDHPTGVTFLA---N-EDLWPGRGPIEMTSMVDMRDGAFRSEYAACKLH
Collimonas_sp_P 304  NSSDQVGRNLMDHPTGVTFLA---N-EDLWPGRGPIEMTSMVDMRDGAFRSEYAACKLH
C.fungivorans_T 304  NSSDQVGRNLMDHPTGVTFLA---N-EDLWPGRGPIEMTSMVDMRDGAFRSEYAACKLH
C.fungivorans_T 304  NSSDQVGRNLMDHPTGVTFLA---N-EDLWPGRGPIEMTSMVDMRDGAFRSEYAACKLH
C.arenae_Ter282 304  NSSDQVGRNLMDHPTGVTFLA---N-EDLWPGRGPIEMTSMVDMRDGAFRSEYAACKLH
C.arenae_Ter10  304  NSSDQVGRNLMDHPTGVTFLA---N-EDLWPGRGPIEMTSMVDMRDGAFRSEYAACKLH
Collimonas_sp_O 304  NSSDQVGRNLMDHPTGVTFLA---N-EDLWPGRGPIEMTSMVDMRDGAFRSEYAACKLH
Collimonas_sp_O 304  NSSDQVGRNLMDHPTGVTFLA---N-EDLWPGRGPIEMTSMVDMRDGAFRSEYAACKLH
Collimonas_sp_O 304  NSSDQVGRNLMDHPTGVTFLA---N-EDLWPGRGPIEMTSMVDMRDGAFRSEYAACKLH
Glaciimonas_sp_ 304  NSSDQVGRNLMDHPTGVTFLA---N-EDLWPGRGPIEMTSMVDMRDGAFRSEYAACKLH
Glaciimonas_sp_ 304  NSSDQVGRNLMDHPTGVTFLA---N-EDLWPGRGPIEMTSMVDMRDGAFRSEYAACKLH
Janthin_UBA1134 304  NSSDQVGRNLMDHPTGVTFLA---N-EDLWPGRGPIEMTSMVDMRDGAFRSEYAACKLH
Herba_seropedic 301  NARDNVGRNLCDHPTGVTFDV---D-EDLWPGRGPIEMTSMVDMRDGAFRSEYAACKLH
Herba_rubrisuba 301  NARDNVGRNLCDHPTGVTFDV---D-EDLWPGRGPIEMTSMVDMRDGAFRSEYAACKLH
AAN39686.1Burkh 308  NSSDQVGRNLMDHPTGVTFLA---N-EDLWPGRGPIEMTSMVDMRDGAFRSEYAACKLH
BAM93252.1Gluco 312  NSSDQVGRNLMDHPTGVTFLA---N-EDLWPGRGPIEMTSMVDMRDGAFRSEYAACKLH
AAF21261.1Panto 318  NSSDQVGRNLMDHPTGVTFLA---N-EDLWPGRGPIEMTSMVDMRDGAFRSEYAACKLH
AFW02570.1Gluco 312  NSSDQVGRNLMDHPTGVTFLA---N-EDLWPGRGPIEMTSMVDMRDGAFRSEYAACKLH
BAD60913.1      312  NSSDQVGRNLMDHPTGVTFLA---N-EDLWPGRGPIEMTSMVDMRDGAFRSEYAACKLH
Glucon_frateri  334  SNVTGRNFVYQTISSRIWLPPSKYTNQFVIGAGGVA-IDDFNSMNF--DHCPLGFV
    
```

Domain 3 GMC_C

```

Col_PMB31      360  LNNMAQTNHAQAALKD-----G-LVGL--KLNQEIRRAARTVNINSFHDILPNPE
Col.prat_Ter291 360  LNNMAQTNHAQAALKD-----G-LVGL--KLNQEIRRAARTVNINSFHDILPNPE
C.pratensis_Ter 360  LNNMAQTNHAQAALKD-----G-LVGL--KLNQEIRRAARTVNINSFHDILPNPE
C.arenae_Cal35  360  LNNMAQTNHAQAALKD-----G-LVGL--KLNQEIRRAARTVNINSFHDILPNPE
Collimonas_sp_P 360  LNNMAQTNHAQAALKD-----G-LVGL--KLNQEIRRAARTVNINSFHDILPNPE
C.fungivorans_T 360  LNNMAQTNHAQAALKD-----G-LVGL--KLNQEIRRAARTVNINSFHDILPNPE
C.fungivorans_T 360  LNNMAQTNHAQAALKD-----G-LVGL--KLNQEIRRAARTVNINSFHDILPNPE
C.arenae_Ter282 360  LNNMAQTNHAQAALKD-----G-LVGL--KLNQEIRRAARTVNINSFHDILPNPE
C.arenae_Ter10  360  LNNMAQTNHAQAALKD-----G-LVGL--KLNQEIRRAARTVNINSFHDILPNPE
Collimonas_sp_O 360  LNNMAQTNHAQAALKD-----G-LVGL--KLNQEIRRAARTVNINSFHDILPNPE
Collimonas_sp_O 360  LNNMAQTNHAQAALKD-----G-LVGL--KLNQEIRRAARTVNINSFHDILPNPE
Collimonas_sp_O 360  LNNMAQTNHAQAALKD-----G-LVGL--KLNQEIRRAARTVNINSFHDILPNPE
Glaciimonas_sp_ 360  LNNMAQTNHAQAALKD-----G-LVGL--KLNQEIRRAARTVNINSFHDILPNPE
Glaciimonas_sp_ 360  LNNMAQTNHAQAALKD-----G-LVGL--KLNQEIRRAARTVNINSFHDILPNPE
Janthin_UBA1134 360  LNNMAQTNHAQAALKD-----G-LVGL--KLNQEIRRAARTVNINSFHDILPNPE
Herba_seropedic 357  ISNASQVASVTKEVLA-----G-YFGK--RLEEQILFRAARRSITKNALEQLPDRN
Herba_rubrisuba 357  ISNASQVASVTKEVLA-----G-YFGK--RLEEQILFRAARRSITKNALEQLPDRN
AAN39686.1Burkh 364  LSNLSRIDQETQKIFKA-----G-KMKPDELDAQIRDRSARYVQFDCFHEILPQPE
BAM93252.1Gluco 368  YNNTAQNRSRAGMKALSM-----G-LVGL--KLNQEIRRAARTVNINSFHDILPNPE
AAF21261.1Panto 374  LNNLSRVVTATQQAALKK-----G-LVGL--KLNQEIRRAARTVNINSFHDILPNPE
AFW02570.1Gluco 369  MVDDNQVDFATGLAAK-----G-YVVK--ELEEQIRYGS SHAVRVFSHNEGIADPD
BAD60913.1      369  MVDDNQVDFATGLAAK-----G-YVVK--ELEEQIRYGS SHAVRVFSHNEGIADPD
Glucon_frateri  391  GGSPVWVWQAGLKPAAAI GTGGGTPRWGS--AYKGAIDTYKHSIGVDAHGSN MAYRD
    
```


Domain 3 GMC_C

```

Col_PMB31      409 NRIRPSSSEKRDALGIPQPEITYSIDDYVKKSAALLTHDITYASIAAMFGGTEVVF---A--D
Col.prat_Ter291 409 NRIRPSSSEKRDALGIPQPEITYSIDDYVKKSAALLTHDITYASIAAMFGGTEVVF---A--D
C.pratensis_Ter 409 NRIRPSSSEKRDALGIPQPEITYSIDDYVKKSAALLTHDITYASIAAMFGGTEVVF---A--D
C.arenae_Cal35  409 NRIRPSSSEKRDALGIPQPEITYSIDDYVKKSAVLTHTDITYASIAAMFGGTEVVF---D--D
Collimonas_sp_P 409 NRIRPSSSEKRDALGIPQPEITYSIDDYVKKSAVLTHTDITYASIAAMFGGTEVVF---D--D
C.fungivorans_T 409 NRIRPSSSEKRDALGIPQPEITYSIDDYVKKSAVLTHTDITYASIAAMFGGTEVVF---D--D
C.fungivorans_T 409 NRIRPSSSEKRDALGIPQPEITYSIDDYVKKSAVLTHTDITYASIAAMFGGTEVVF---D--D
C.arenae_Ter282 409 NRIRPSSSEKRDALGIPQPEITYSIDDYVKKSAVLTHTDITYASIAAMFGGTEVVF---A--D
C.arenae_Ter10  409 NRIRPSSSEKRDALGIPQPEITYSIDDYVKKSAVLTHTDITYASIAAMFGGTEVVF---A--D
Collimonas_sp_O 409 NRIRPSSSEKRDALGIPQPEITYSIDDYVKKSAVLTHTDITYASIAAMFGGTEVVF---D--D
Collimonas_sp_O 409 NRIRPSSSEKRDALGIPQPEITYSIDDYVKKSAVLTHTDITYASIAAMFGGTEVVF---D--D
Collimonas_sp_O 409 NRIRPSSSEKRDALGIPQPEITYSIDDYVKKSAVLTHTDITYASIAAMFGGTEVVF---D--D
Glaciimonas_sp_ 409 NRIRPSSSEKRDALGIPQPEITYSIDDYVKKSAVLTHTDITYASIAAMFGGTEVVF---D--D
Glaciimonas_sp_ 409 NRIRPSSSEKRDALGIPQPEITYSIDDYVKKSAVLTHTDITYASIAAMFGGTEVVF---D--D
Janthin_UBA1134 409 NRIRPSSSEKRDALGIPQPEITYSIDDYVKKSAVLTHTDITYASIAAMFGGTEVVF---A--D
Herba_seropedic 406 NRVTLG-DKKDELGLPVEALYWNDDYVVKGTQKTRCYDAIASKLGTNKH---SKSG
Herba_rubrisuba 406 NRVTLG-DKKDELGLPVEALYWNDDYVVKGTQKTRCYDAIASKLGTNKH---SKSG
AAN39686.1Burkh 415 NRIVPSKTATDAIGIPRPEITYAIDDYVVKGAHTRVYATAAKVLGGTDVVF---N--D
BAM93252.1Gluco 417 NRIVLSKDYKDALGIPHPEITYDYVVKSAASRQRRLMDIAKAMGGTEIEM---T--P
AAF21261.1Panto 423 NRITLSKTRKDPHGLPCPIIYYDVGIVVKGAEASHAQLEHIGQIFDAKKEFTI---S--Q
AFW02570.1Gluco 418 NRITLSKTHKDVLGIPHPEVYKLPYVTVKSCDHTKLEKELMALMSGTDPQW---T--K
BAD60913.1      418 NRITLSKTHKDVLGIPHPEVYKLPYVTVKSCDHTKLEKELMALMSGTDPQW---T--K
Glucon_frateuri 449 VYLDLDPWTKDAYGCPLLRMTFTWKNDIRMNQYVVSKEIETAKAMGATKANLVHLNAGO
    
```

Domain 3 GMC_C

```

Col_PMB31      464 D----FAPNNHIMGAVIMGGDPRDSVVDACRSHDHENLFIASSAVMPVAGTVNCTLTIA
Col.prat_Ter291 464 D----FAPNNHIMGAVIMGGDPRDSVVDACRSHDHENLFIASSAVMPVAGTVNCTLTIA
C.pratensis_Ter 464 D----FAPNNHIMGAVIMGGDPRDSVVDACRSHDHENLFIASSAVMPVAGTVNCTLTIA
C.arenae_Cal35  464 D----FAPNNHIMGAVIMGGDPRDSVVDACRSHDHENLFIASSAVMPVAGTVNCTLTIA
Collimonas_sp_P 464 D----FAPNNHIMGAVIMGGDPRDSVVDACRSHDHENLFIASSAVMPVAGTVNCTLTIA
C.fungivorans_T 464 D----FAPNNHIMGAVIMGGDPRDSVVDACRSHDHENLFIASSAVMPVAGTVNCTLTIA
C.fungivorans_T 464 D----FAPNNHIMGAVIMGGDPRDSVVDACRSHDHENLFIASSAVMPVAGTVNCTLTIA
C.arenae_Ter282 464 D----FAPNNHIMGAVIMGGDPRDSVVDACRSHDHENLFIASSAVMPVAGTVNCTLTIA
C.arenae_Ter10  464 D----FAPNNHIMGAVIMGGDPRDSVVDACRSHDHENLFIASSAVMPVAGTVNCTLTIA
Collimonas_sp_O 464 D----FAPNNHIMGAVIMGGDPRDSVVDACRSHDHENLFIASSAVMPVAGTVNCTLTIA
Collimonas_sp_O 464 D----FAPNNHIMGAVIMGGDPRDSVVDACRSHDHENLFIASSAVMPVAGTVNCTLTIA
Collimonas_sp_O 464 D----FAPNNHIMGAVIMGGDPRDSVVDACRSHDHENLFIASSAVMPVAGTVNCTLTIA
Glaciimonas_sp_ 464 N----FAPNNHIMGAVIMGGDPRDSVVDACRSHDHENLFIASSAVMPVAGTVNCTLTIA
Glaciimonas_sp_ 464 N----FAPNNHIMGAVIMGGDPRDSVVDACRSHDHENLFIASSAVMPVAGTVNCTLTIA
Janthin_UBA1134 464 D----FAPNNHIMGAVIMGGDPRDSVVDACRSHDHENLFIASSAVMPVAGTVNCTLTIA
Herba_seropedic 462 A----FSNRQHIITGLSMGLDPATSVTDWGRAHDHENLFIASSAVMPVAGTVNCTLTIA
Herba_rubrisuba 462 D----FSNRQHIITGLSMGLDPATSVTDWGRAHDHENLFIASSAVMPVAGTVNCTLTIA
AAN39686.1Burkh 470 E----FAPNNHIMGAVIMGGDPRDSVVDACRSHDHENLFIASSAVMPVAGTVNCTLTIA
BAM93252.1Gluco 472 Y----ETPNNHITGVTIMGHDPDRDSVVDKWLRTDHSNLEIATGATMAASGTVNSTLTIA
AAF21261.1Panto 478 G----LNANNHIMGAVIMGGDPRDSVVDACRSHDHENLFIASSAVMPVAGTVNCTLTIA
AFW02570.1Gluco 473 G----YFPOCHPSGSTIMGTDPTNSVVDGECRTHDHENLFIASSAVFSSVGTGNITLTIA
BAD60913.1      473 G----YFPOCHPSGSTIMGTDPTNSVVDGECRTHDHENLFIASSAVFSSVGTGNITLTIA
Glucon_frateuri 509 PFDTRHYQTTHIGGALMGTDPQTSALNRYLQSWDVSNEVIGSNAFPOCMGYNPTGMVA
    
```



```

Domain 3 GMC_C      ALSLR-----L
Col_PMB31           520 ALSLRIADTLRTV-----L
Col.prat_Ter291     520 ALSLRIADTLRTV-----L
C.pratensis_Ter     520 ALSLRIADTLRTV-----L
C.arenae_Cal35      520 ALSLRIADTLRTV-----L
Collimonas_sp_P     520 ALSLRIADTLRTV-----L
C.fungivorans_T     520 ALSLRIADTLRTV-----L
C.fungivorans_T     520 ALSLRIADTLRTV-----L
C.arenae_Ter282     520 ALSLRIADTLRTV-----L
C.arenae_Ter10      520 ALSLRIADTLRTV-----L
Collimonas_sp_O     520 ALSLRIADTLRTV-----L
Collimonas_sp_O     520 ALSLRIADTLRTV-----L
Collimonas_sp_O     520 ALSLRIADTLRTV-----L
Glaciimonas_sp_     520 ALSLRIADTLRTV-----L
Glaciimonas_sp_     520 ALSLRIADTLRTV-----L
Janthin_UBA1134     520 ALALRISDTLR-----L
Herba_seropedic     518 ALALRTADKIIIEES-----RH-A
Herba_rubrisuba     518 ALSLRTADKIIIEES-----RH-A
AAN39686.1Burkh     526 ALALRMSDTLKKKE-----V
BAM93252.1Gluc     528 ALSLRAADAILNDL-----KQ-G
AAF21261.1Panto     534 ALGLFAAHDISLRM-----KGDA
AFW02570.1Gluc     529 ALALRVAASLKKEM-----LH-A
BAD60913.1          529 ALALRVAASLKKEM-----LH-A
Glucon_frateuri     569 ALAYWAAYHIRTYYLKSFGPLVQ-A

```

Figure S2: Highlight of the active domains detected in the large subunit of the GMC enzyme and of the cysteine rich region

Domain 1 : FAD ; Domain 2 and 3 correspond to GMC sites. Each line corresponds to a protein sequence and its localisation. The abbreviations correspond to those presented in the phylogenetic tree in Figure 6. Gluc_BAH805545.1, gluconate dehydrogenase; Gluc_BAD60913.1, sorbitol dehydrogenases; *Burkholderia*, glucose dehydrogenase; Gluc_japonicus, fructose dehydrogenase; *Pantoea_agglo.*, choline dehydrogenase; Gluc_oxydans, sorbitol dehydrogenases.

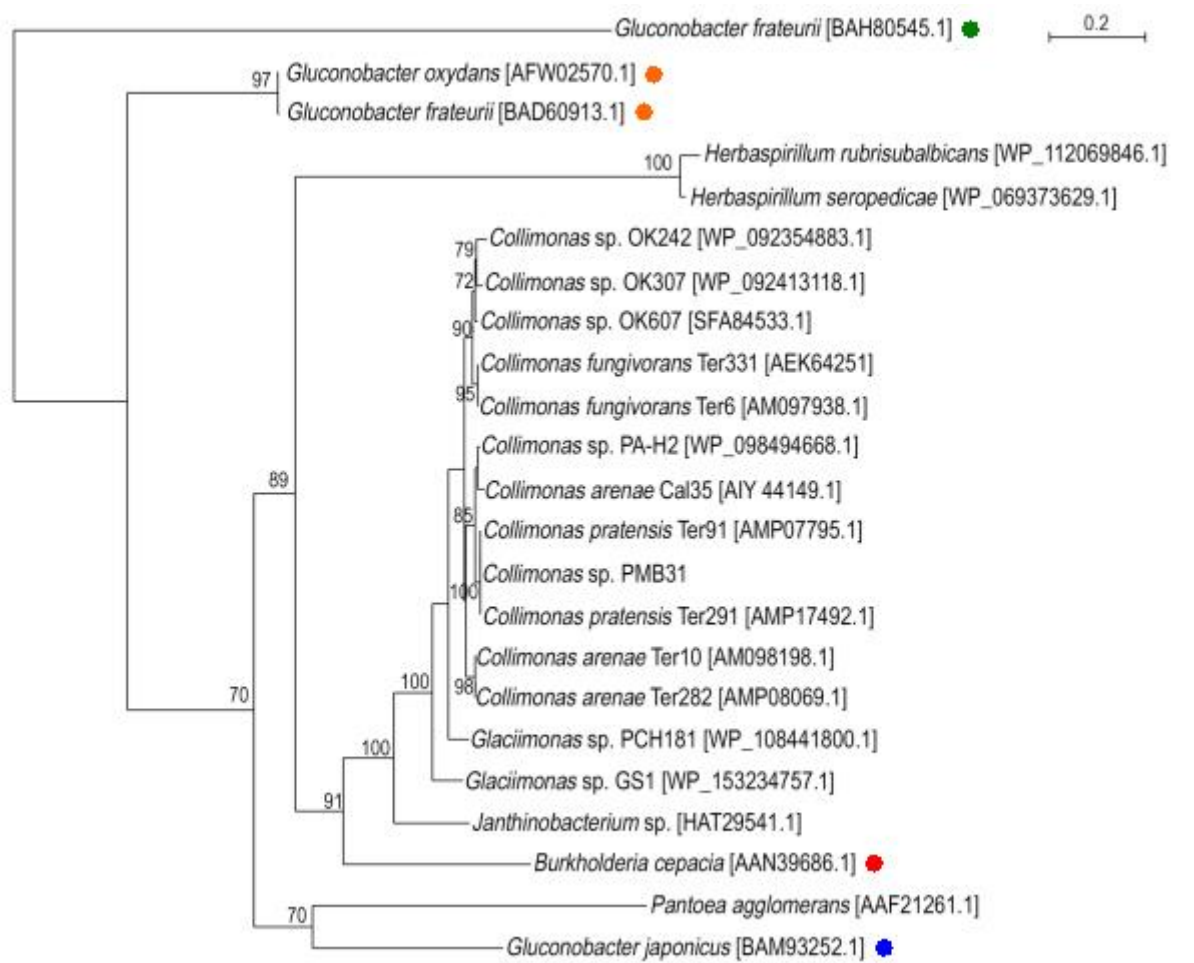


Figure S3: Phylogenetic tree based on protein sequence of the large subunit of different GMC-DH

Comparison of the GdhL sequence from PMB3(1) with homologous protein sequences from a set of 22 different genera or species related to *Collimonas* and available on international databases were analysed among them, 11 were assigned to the *Collimonas* genus. Other genera taxonomically close to *Collimonas* were chosen (*Glaciimonas*, *Janthinobacterium*, *Herbaspirillum* and *Burkholderia*). Enzymes belonging to the GMC family and with a demonstrated function were included in the analysis such as Gluconate DH (GADH ; green circle), Sorbitol DH (SDH ; orange circle), Fructose DH (FDH ; blue circle) and Glucose DH (GDH ; red circle). For these protein sequences, the accession number from NCBI is indicated between brackets.

CHAPITRE 3

Le sidérophore de la souche *Collimonas pratensis* PMB3(1) est impliqué dans l'altération de minéraux secondaires *via* son action complexante

1. Préambule

L'analyse du génome de la souche modèle *Collimonas pratensis* PMB3(1) a révélé la présence d'un cluster de gènes potentiellement impliqué dans la synthèse d'un sidérophore. Une étude a suggéré que ce sidérophore serait probablement de l'ornibactine mais elle se base seulement sur des prédictions bioinformatiques et aucune caractérisation chimique n'a été réalisée (Song *et al.*, 2015). La question de la caractérisation chimique de ce sidérophore ainsi que son implication dans l'altération des minéraux a été adressée *via* une approche avec *a priori* par mutagénèse ciblée.

2. **Article 3 : The mineral weathering ability of *Collimonas pratensis* PMB3(1) involves a Malleobactin-mediated iron acquisition system**

L. Picard, C. Paris, T. Dhalleine, E. Morin, P. M. Oger, M. P. Turpault, S. Uroz
Environmental Microbiology (2021)

<https://doi.org/10.1111/1462-2920.15508>

RESUME : L'altération des minéraux par les microorganismes est considérée comme étant une succession de mécanismes basés sur l'acidification et la chélation. Tandis que le rôle de l'acidification est établi, le rôle des sidérophores est difficile à distinguer de l'effet de l'acidification. La souche modèle *Collimonas pratensis* PMB3(1) a été utilisée pour déterminer le rôle des sidérophores dans l'altération des minéraux. Nous avons identifié une seule région qui comporte un gène codant une enzyme impliquée dans la synthèse de peptide indépendante des ribosomes (non-ribosomal peptide synthetase ; NRPS) et qui est responsable de la biosynthèse de sidérophore dans le génome de PMB3(1). En combinant des tests de chélation du fer, de la mutagénèse ciblée et des analyses chimiques (HPLC, LC-ESI-HRMS), nous avons déterminé que le sidérophore produit était une malléobactine X et que sa production était régulée par la concentration en fer disponible dans le milieu. En comparant cette séquence avec les séquences génomiques d'autres *Collimonas*, nous en avons déduit que la production de malléobactine semblait être un trait fonctionnel conservé pour ce genre bactérien, néanmoins, certains *Collimonas* arborent d'autres systèmes de synthèse de sidérophore. Nous avons aussi révélé en comparant la souche sauvage et son mutant impacté dans la production de malléobactine que la synthèse de ce sidérophore était essentielle pour permettre la dissolution

d'hématite en condition non-acidifiante. Cette étude représente la première caractérisation d'un sidérophore produit par le genre *Collimonas* et son rôle dans l'altération des minéraux.

Mots clés : *Collimonas pratensis* PMB3(1) ; altération des minéraux ; sidérophore ; malléobactine ; hématite

CONTRIBUTION : J'ai participé au design expérimental, j'ai réalisé les expérimentations excepté les analyses chimiques HPLC et LC-ESI-HRMS où j'ai seulement participé à la préparation des échantillons. J'ai également analysé les résultats et rédigé l'article.

TITLE: The mineral weathering ability of *Collimonas pratensis* PMB3(1) involves a Malleobactin-mediated iron acquisition system

Running title: Mineral weathering role of Malleobactin

AUTHORS: Laura Picard^{1,2}, Cédric Paris^{3,4}, Tiphaine Dhalleine¹, Emmanuelle Morin¹, Philippe Oger⁵, Marie-Pierre Turpault², Stéphane Uroz^{1,2*}

¹ Université de Lorraine, INRAE, UMR1136 « Interactions Arbres-Microorganismes », F-54280 Champenoux, France

² INRAE, UR1138 « Biogéochimie des Ecosystèmes Forestiers », F-54280 Champenoux, France

³ Université de Lorraine, EA 4367 « Laboratoire d'Ingénierie des Biomolécules », Ecole Nationale Supérieure d'Agronomie et des Industries Alimentaires (ENSAIA), F-54505 Vandœuvre-lès-Nancy, France

⁴ Plateau d'Analyse Structurale et Métabolomique (PASM) - SF4242 EFABA, F-54505 Vandœuvre-lès-Nancy, France

⁵ Université de Lyon, INSA de Lyon, CNRS UMR 5240 « Microbiologie, Adaptation et Pathogénie », F-69621, Villeurbanne France

* **Corresponding author:** Mailing address:

Université de Lorraine, INRAE, UMR 1136 “Interactions Arbres Microorganismes”, 54280 Champenoux, France. Phone: +33 (0)3 83 39 40 81, Fax: +33 (0)3 83 39 40 69. E-mail: stephane.uroz@inrae.fr.

Key words: *Collimonas pratensis* PMB3(1); mineral weathering; siderophore; malleobactine; hematite

SUMMARY

Mineral weathering (MW) by microorganisms is considered to occur through a succession of molecular mechanisms based on acidification and chelation. While the role of acidification is established, the role of siderophores is difficult to disentangle from the effect of the acidification. We took advantage of the ability of strain *Collimonas pratensis* PMB3(1) to weather minerals but not to acidify depending on the carbon source to address the role of siderophores in MW. We identified a single non-ribosomal peptide synthetase (NRPS) responsible for siderophore biosynthesis in the PMB3(1) genome. By combining iron-chelating assays, targeted mutagenesis and chemical analyses (HPLC and LC-ESI-HRMS), we identified the siderophore produced by strain PMB3(1) as malleobactin X and how its production depends on the concentration of available iron. Comparison with the genome sequences of other collimonads evidenced that malleobactin production seems to be a relatively conserved functional trait, though some collimonads harbored other siderophore synthesis systems. We also revealed by comparing the wild-type strain and its mutant impaired in the production of malleobactin that the ability to produce this siderophore is essential to allow the dissolution of hematite under non-acidifying conditions. This study represents the first characterization of the siderophore produced by collimonads and its role in mineral weathering.

Originality-Significance Statement

Nutrient access is an essential process in nutrient-poor and non-amended ecosystems. To deal with such conditions, plants have developed particular strategies to adapt, noticeably through the selection in their rhizosphere of functional communities effective at mobilizing the nutrients. Among them, bacteria have been shown to be effective at mineral weathering (MW) and at promoting plant growth. Acidification and chelation are considered as the main mechanisms used by MW bacteria. However, our understanding of the molecular mechanisms and genes involved remains limited. While the role of acidification is established, the role of siderophores is difficult to disentangle from the effect of the acidification. In strain PMB3(1) of *Collimonas pratensis*, the mineral weathering effectiveness depends on the carbon source used for growth. Its high MW effectiveness in presence of glucose is explained by its strong ability to acidify the medium. On the contrary, in presence of mannitol or trehalose, this acidification is moderate but the MW ability is partly conserved, suggesting that strain PMB3(1) is capable of using alternative mechanisms to weather minerals. The variable MW effectiveness of strain PMB3(1) and its ability to promote plant growth make it a good model to decipher MW mechanisms. The novel results obtained in this study through the combination of

bioinformatics, chemical and phylogenetic analyses allowed us to identify and to characterized the siderophore produced by this model strain. This study represents the first experimental demonstration of the siderophore produced by *Collimonas* (*i.e.*, malleobactin). We evidenced how conserved is this iron acquisition system among collimonads and improved the siderophore prediction tools. Noticeably, our results will permit a better discrimination of ornibactin and malleobactin. Last, this study demonstrated for the first time the role of this iron acquisition system in mineral weathering. Our findings offer relevant information for different fields of research such as environmental genomics and chemistry, and soil sciences.

INTRODUCTION

Iron is an essential micronutrient for living organisms. It is involved in key cellular processes such as DNA synthesis, respiration, photosynthesis or metabolism (Rout and Sahoo, 2015). Due to its oxidoreduction potential iron is used by several enzymes as energy source (*i.e.* cytochrome subunit of enzymes or cofactors). Although this element is abundant in the Earth crust, its bioavailability is strongly reduced in aerobic soils ranging from neutral to basic pH, while in acidic soils such as in temperate forests, its bioavailability is higher. However, it tends to decrease from the topsoil horizon to the deeper horizons due to the precipitation of iron as iron oxi-hydroxides and its adsorption on different substrates such as organic matter and primary minerals. In soils, the main sources of iron are the primary minerals (*i.e.*, granite and other Fe-carrying minerals and rocks), the secondary minerals such as iron oxi-hydroxides (*i.e.*, hematite, goethite) and the adsorbed forms. However, most of those minerals dissolve at much slower rates than those required to support plant and microbial growth (Lindsay, 1995). Consequently, iron access is subject to important competitions between living organisms (Butaitė *et al.*, 2017).

The ability to mobilize iron from the different soil compartments (*i.e.*, minerals, rocks, organic matter) has been reported for several plants, fungi, and bacteria. Noticeably, effective iron mobilizing bacteria have been evidenced in the rhizosphere of various plants and in different soils (Uroz *et al.*, 2009a). The presence of such bacteria and their relative enrichment in the rhizosphere compared to the surrounding bulk soil suggest that these functional communities are recruited in the root environment to make iron bioavailable for plant nutrition. Among the effective iron mobilizing bacteria encountered in nutrient-poor forest soils, bacteria belonging to the genus *Collimonas* have been described for their effectiveness in mobilizing iron (Uroz *et al.*, 2009b, 2007; Leveau *et al.*, 2010). Although, collimonads are considered as members of the rare biosphere in the soil (Leveau *et al.*, 2010), they can be the dominant taxa in specific habitats such as in the mineralosphere (Uroz *et al.*, 2015) or in the mycorrhizosphere (Lepleux *et al.*, 2012; Uroz *et al.*, 2012). Representatives of this genus have been isolated from various nutrient-poor environments (*i.e.*, grass land, forests soil; (Uroz *et al.*, 2009b, 2014; Hoppener-Ogawa *et al.*, 2008) and often in the close vicinity of fungi (De Boer, 2004; Uroz *et al.*, 2012). Some *Collimonas* species have been used as plant growth promoting agent (*e.g.* tomatoes) to protect them against fungal pathogens (Kamilova *et al.*, 2007; Senechkin *et al.*, 2013; Doan *et al.*, 2020) and to promote the growth of *Pinus sylvestris* seedlings (Koele *et al.*, 2009). All these characteristics make this genus an interesting plant growth-promoting (PGP) candidate.

The functional screening of *Collimonas* collections revealed that all the collimonads were especially effective at weathering minerals compared to other genera. Among them, *Collimonas pratensis* strain PMB3(1) appeared as the most effective (Uroz *et al.*, 2009b; Picard *et al.*, 2020). This strain is able to solubilize inorganic phosphorous, mobilize iron and dissolve minerals. At the molecular level, this high ability to weather mineral is explained by the ability of the collimonads to produce protons *via* the direct oxidative pathway (Picard *et al.*, 2021). Strain PMB3(1) is capable of strongly acidifying its environment when glucose is used as sole carbon source and to produce high concentration of gluconic acid (Uroz *et al.*, 2009b; Picard *et al.*, 2021). In that respect, the glucose/methanol/choline (GMC) oxidoreductase was identified as responsible for this acidification process in strain PMB3(1) (Picard *et al.*, 2021). Other molecular mechanisms such as complexolysis may also play a role in the dissolution of minerals (Uroz *et al.*, 2009a; Dong, 2010). Indeed, most of the bacteria recruited in the rhizosphere are capable of producing siderophores. To date, different types of siderophores have been reported and new chelating molecules are continuously discovered (Hernandez *et al.*, 2004; Mathew *et al.*, 2014). Siderophores can impact directly (*i.e.*, surface dissolution) or indirectly (*i.e.*, modification of the solution equilibrium) the mineral weathering process, especially when carbon sources other than glucose are available (*i.e.*, mannitol, trehalose) (Holmén and Casey, 1996; Kraemer, 2004; Parrello *et al.*, 2016; Perez *et al.*, 2019).

In absence of acidification, the dissolution of minerals may occur through the action of siderophores (Shirvani and Nourbakhsh, 2010), but no experimental study was done on collimonads to functionally characterize the gene clusters involved and the type of siderophore produced. The ability to chelate iron was evidenced for several *Collimonas* strains (Uroz *et al.*, 2009b; Ballhausen *et al.*, 2016). More recently, bioinformatics analyses identified genes encoding a potential Non-Ribosomal Peptide Synthetase (NRPS) in the genomes of collimonads (*i.e.*, Ter6, Ter91, Ter331, Ter10, Ter282 and Ter291) and predicted the production of ornibactin (Song *et al.*, 2015). In this context, the goals of this study were i) to identify and chemically characterize the siderophore produced by the model *Collimonas pratensis* strain PMB3(1), ii) to investigate how conserved the gene sequences were among collimonads and related genera and iii) to determine the role of the siderophore in mineral weathering. To do this, we combined bioinformatics, genomics, genetics, geochemistry and functional bioassays to decipher the genes conferring the chelating and mineral weathering abilities to strain PMB3(1) and other collimonads. The use of high-performance liquid chromatography (HPLC) coupled to high-resolution and tandem mass spectrometry (HRMS and MS/MS) allowed us to identify the siderophore produced as malleobactin X.

Table 1: List of bacterial strains, constructions and primers used in this study

Strains, plasmids or primers	Characteristics	References
Strains		
<i>Collimonas pratensis</i>		
Strain PMB3(1)	Wild type strain	Uroz <i>et al.</i> , 2007
Δ NRPS (PMB3(1)(NRPS::Gm))	Wild type strain, with Gm ^R cassette inserted in double crossing over	This study
<i>Escherichia coli</i>		
DH5 α	sup E44, Δ lacU169, (Φ lacZ Δ M15), recA1, endA1, hsdR17, thi-1, gyrA96, relA1	Lab collection
S17.1 λ pir	Trp ^R Sm ^R recA, thi, pro, hsdRM+, RP4: 2-Tc:Mu: Km Tn7 λ pir	Lab collection
Plasmids		
pUC1318	Amp ^R , Gm ^R	Lab collection
pGEM-T Easy	Amp ^R	Kit Promega
pGEM-NRPS	pGEM-T Easy carrying a NRPS fragment	This study
pGEM-NRPS::Gm	pGEM-NRPS with insertion in SmaI of the Gm ^R cassette	This study
pK19mob	Km ^R	Lab collection
pK19mob-NRPS::Gm	pK19mob containing a EcoRI fragment obtained from pGEM-NRPS::Gm	This study
Primers		
For-NRPS	5'-GCCCATCCAATACGCCGATTAC-3'	T _m (° C) 54 This study
Rev-NRPS	5'-GGTCGGACCGTAGTGATTGATG-3'	This study

MATERIALS AND METHODS

Bacterial strains and growth media

Bacterial strains, plasmids and primers are listed in Table 1. The model *Collimonas pratensis* strain PMB3(1) studied here was isolated from oak (*Quercus petraea*)–*Scleroderma citrinum* ectomycorrhizae sampled in the organo-mineral soil horizon from the long term experimental forest site of Breuil-Chenue (Morvan region, France; for sampling details see (Calvaruso *et al.*, 2007). This model strain was chosen for its high mineral weathering effectiveness (Uroz *et al.*, 2009b, 2007). All strains were grown at 25°C, except the strains of *Escherichia coli*, which were grown at 37°C. The media used were Luria-Bertani (LB) and AB medium supplemented with mannitol (2 g/l final concentration) as carbon source (ABm; (Chilton *et al.*, 1974). Gentamycin was added to the media at 20 µg/ml (final concentration) when required.

Preparation of bacterial inocula

For each growth or functional assay presented below, the wild type (WT) strain PMB3(1) and the mutant strain affected in its ability to mobilize iron (Δ NRPS) were recovered from glycerol stock (-80 °C) and grown on ABm solid medium, amended with gentamycin for the Δ NRPS mutant. After a 2-day incubation at 25 °C, one colony of each strain was inoculated in liquid ABm medium (10 ml) and incubated for 2 days at 25 °C under 200 rpm agitation. The cultures were then centrifuged at 8,000 g for 15 min at 10 °C and the pellet was washed twice with 5 ml of sterile Milli-Q water to eliminate all culture medium and antibiotic traces. The pellet was recovered in 5 ml of sterile Milli-Q water. To control the quantity of cells inoculated, the optical density (OD) was measured at 590 nm and cell suspensions were adjusted at 0.90 ± 0.03 .

Siderophore activity

To determine the siderophore activity, the Chrome Azurol S (CAS) assay was performed according to (Schwyn and Neilands, 1987) using the solid and liquid versions. Both assays are based on the competition for iron between the CAS-Fe(III) complex and siderophores. In absence of chelating agent, iron is associated to the Chrome Azurol S and forms a blue complex. When a siderophore with a higher affinity for iron is present, iron is released from the CAS-Fe(III) complex and the colour of the CAS solution turns to yellow.

For the solid CAS assay, a volume of 5 µl of the bacterial inoculum of the WT or the mutant strains were inoculated on CAS agar plates and incubated at 25 °C for 3 days. The presence of yellow halo was scored and its diameter as well as that of the colony diameter was measured, to determine siderophore production and the growth.

For the liquid CAS assay, a volume of 100 μ l of the bacterial inoculum of the WT or the mutant strains were inoculated in liquid ABm medium devoid of iron (10 ml) and amended with gentamycin for the mutant strain. After 2-days incubation at 25 °C, the cultures were centrifugated at 8,000 g for 15 min at 10 °C to recover the culture supernatant. The supernatant was then filtered at 0.22 μ m (GHP Acrodisc 25 mm syringe filter; PALL) and stored at -20 °C for further analyses. To evaluate the presence of siderophore activity, 100 μ l of the filtered supernatant was added to 100 μ l of liquid CAS medium devoid of carbon source in a 96-well microplate. The supernatant of non-inoculated medium was used as a negative control. After 1 hour of incubation at room temperature in the dark, the absorbance was measured at OD = 655 nm with a microplate reader (Bio-Rad, model iMark). The decrease of absorbance corresponds to a change from blue color of the CAS complex to a yellow color when a siderophore is present.

Δ NRPS mutant construction

Total DNA was extracted from the WT strain using the protocol of (Pospiech and Neumann, 1995). To construct a targeted mutant of the gene *mbaA*, a portion of this gene was amplified using the primers For-NRPS and Rev-NRPS (Table 1). These primers amplified a region of ca. 2 kb of the *mbaA* gene characterized by the presence of a natural *SmaI* site in its center. The purified PCR product was ligated into the pGEM-T Easy plasmid (Promega) resulting in the plasmid pGEM-NRPS (Table 1). The plasmid pGEM-NRPS was then digested with *SmaI* to introduce the *SmaI*-digested gentamycin (Gm) resistance cassette from plasmid pUC1318, resulting in the plasmid pGEM-NRPS::*Gm*. A fragment containing the *mbaA*::*Gm* cassette was then obtained by *EcoRI* restriction and cloned in the plasmid pK19mob, resulting in the pK19mob-NRPS::*Gm* plasmid. This construction was transferred to *E. coli* S17.1 λ pir and then to strain PMB3(1) by bi-parental conjugation. Δ NRPS mutants were recovered after 5 days of incubation at 25 °C on gentamycin-containing ABm plates and organized in 96-microtiter plates. The transconjugants obtained were verified by PCR with For-NRPS and Rev-NRPS primers, to differentiate the single and double crossing-over events. Several single and double crossing-over mutants were conserved. The experiments described in our study were done using a double crossing-over mutant named Δ NRPS.

Minimal concentration of iron inhibiting siderophore production

To evaluate the concentration of iron inhibiting the siderophore production, the WT strain and its Δ NRPS mutant were incubated with different concentrations of iron. Briefly, in a 96-wells microplate, 10 μ l of calibrated suspension (described above) of WT and Δ NRPS were

inoculated in 180 μ l of ABm medium devoid of iron and 10 μ l of a FeCl₃ solution. Different FeCl₃ solutions were prepared in Milli-Q water to obtain final concentrations of iron ranging from 0 to 5 mg/l (0; 0.1; 0.2; 0.3; 0.5; 0.6; 0.7; 0.8; 0.9; 1.0; 1.5; 2.0; 2.5; 5.0 mg/l). A non-inoculated condition was performed as control. After 3 days of incubation, the 96-wells microplate was centrifuged (1,100 g; 15 min) and 100 μ l of supernatant were transferred to a new 96-wells microplate and mixed with 100 μ l of CAS liquid solution (as described above). This solution was incubated 1 h in the dark before measuring the absorbance at 655 nm.

Impact of iron concentration and iron competition on the growth of strain PMB3(1) and its Δ NRPS mutant

To determine how iron concentration affects the growth of the WT strain and its Δ NRPS mutant, cultures were done in ABm medium devoid of iron and supplemented or not with FeCl₃ (final concentration of iron: 0; 0.1; 0.2; 0.3; 0.5; 1.0 mg/l). A volume of 10 μ l each of bacterial inoculum (*i.e.*, WT and mutant) was added to 190 μ l each of ABm medium described above. In addition, a competition assay was done to determine how iron availability may affect the growth of strain PMB3(1) and its Δ NRPS mutant. To do it, a strong chelator agent (*i.e.*, 10 mM of EDTA) was added or not to the culture medium supplemented with 1 mg/l of iron. All samples were tested in triplicate. The 96-well microplate was incubated at 25 °C on orbital shaking during 3 days in a microplate reader (Tecan infinite M200 pro). The absorbance was measured at OD = 600 nm every 3 hours. To evaluate the growth of the strains, the slope of the exponential phase (*i.e.* growth rate) was calculated for each condition and replicate.

Chemical characterization of the siderophore

Siderophore production and purification

To enable the chemical characterization of the siderophore(s) produced by strain PMB3(1), cultures of 50 ml were done in iron-depleted ABm culture medium. The WT strain and its Δ NRPS mutant were incubated 3 days at 25 °C under shaking (200 rpm). A non-inoculated condition was used as negative control. After this incubation period, the cultures were centrifugated at 8,000 g for 15 min and the supernatant was filtered at 0.22 μ m and stored at -20 °C for further analyses. The siderophore was concentrated and purified using a Sep pack Vac 6cc tC18 Cartridges (Waters). The column was first washed with 10 ml of 100 % methanol, then it was equilibrated with 10 ml of 0.01% trifluoroacetic acid (TFA) to acidify the column. Next, 25 ml of supernatant was applied on the column. The siderophore was eluted with 5 ml of 10 % methanol solution (*i.e.* methanol / MQ water). The eluent was collected into 2 ml

ependorf tubes and evaporated in a speedvacuum system for 5h. The dried samples were dissolved in 100 μ l of MQ water. The siderophore activity was tested using the liquid CAS assay on the culture filtrate (0.22 μ m) as well as on the Sep pack purified solution.

Ferrisiderophore (FS) preparation

A siderophore-containing extract was analyzed in the presence and in the absence of an iron(III) acetate solution. Iron(III) solution was prepared with a 4-fold excess of acetate relative to iron (25 mM) / acetate (100 mM). Iron(III) chloride (FeCl_3) was initially dissolved in glacial acetic acid before dilution with water to desired volume (pH=1.90) and finally double filtrated.

The formation of ferrisiderophore was carried out under non-inert atmosphere as follows. Extract was first diluted 10 times (pH = 4.01) and pH was adjusted at pH 2.79 with 0.1 M HCl. Then, iron(III) acetate solution (25 mM, 100 μ l) was added to 400 μ l of diluted extract to get the final reaction mixture (500 μ l), at pH 2.46.

The control test was simply carried out by mixing 400 μ l of 10-times diluted extract with 100 μ l of pure water, pH being adjusted under pH 3 with 0.1 M HCl.

High Performance Liquid Chromatography (HPLC) analyses and fractionation

The analysis was done on Sep pack treated supernatants coming from inoculated (WT and Δ NRPS strains) or non-inoculated (control medium) media. Fifty microliters of each supernatant were injected onto a Gemini C18 column (150 x 3.0 mm internal diameter, 5 μ m particle size, Phenomenex) equilibrated with Milli-Q water with 0.01% formic acid at 25 °C and connected to a Shimadzu Prominence HPLC system. A gradient elution of Milli-Q water with 0.01% formic acid (buffer A) and acetonitrile with 0.01% formic acid (buffer B) for 40 min was used at a flow-rate of 1 ml/min and detection was monitored with diode array UV-vis detector at 210 nm. The potential peaks of interest were identified by comparing HPLC spectra and retention times from the WT and Δ NRPS strains and the control medium samples.

To determine the siderophore activity of the peaks of interest, a fraction collect was performed in 96-wells microplate using fraction collector system (FRC-10A fraction collector system, Shimadzu). For each sample, fractions of 200 μ l were recovered each 12 s using the same HPLC conditions described above. Fractions were then evaporated in a speedvacuum system. Samples were suspended in 25 μ l of CAS liquid assay diluted with 25 μ l of Milli-Q water and transferred in a new microplate for absorbance measure at 655 nm.

To perform further mass spectrum analyses, the major peaks identified were collected and the fractions combined to concentrate the metabolite of interest.

Liquid chromatography coupled to high-resolution electrospray mass spectrometry (LC-ESI-HRMS)

Qualitative and semi-quantitative analysis of siderophores (S) and ferrisiderophores (FS) was realized using a LC-ESI-HRMS method previously described by (Paris *et al.*, 2021). The UHPLC-MS system (ThermoFisher Scientific, San Jose, CA, USA) consists in a quaternary UltiMate 3000TM solvent delivery pump connected to a photodiode array detector (PDA) and a LTQ-OrbitrapTM hybrid mass spectrometer. Ten microliters of pre-purified HPLC extract were separated on a C18 Alltima reverse phase column (150 x 2.1 mm, 5 μ m - Grace/Alltech, Darmstadt, Germany) equipped with a C18 Alltima pre-column (7.5 x 2.1 mm, 5 μ m) at 25 °C. The flow rate was set at 0.2 ml/min and mobile phases consisted in water modified with nonafluoropentanoic acid (NFPA) (5 mM) for A and pure methanol for B. Compounds of interest were separated thanks to a program of 36 min, using a linear gradient from 5 % to 98 % of B for 25 min.

Mass analysis was carried out in ESI positive ion mode (ESI⁺) and mass spectrometry conditions were as follows: spray voltage was set at 4.5 kV; source gases were set (in arbitrary units/min) for sheath gas, auxiliary gas and sweep gas at 40, 5 and 5, respectively; capillary temperature was set at 300°C; capillary voltage at 46 V; tube lens, split lens and front lens voltages at 112 V, - 70 V and - 6.25 V, respectively.

Full scan MS spectra were performed at high resolution ($R=60000$ at m/z 400) on the OrbitrapTM analyzer from 120 to 2000 m/z to obtain exact masses of siderophores and ferrisiderophores on the HPLC purified peaks as well as on the total extract. MS² full scan spectra were additionally realized for structural elucidation thanks to LTQTM analyzer (Linear Trap Quadrupole). Raw data were processed using the XCALIBURTM software program (version 2.1, <http://www.thermoscientific.com>).

Hematite weathering assay

Mineral description

Hematite used as mineral in our study comes from a batch isolated in Brazil. Hematite is an iron-oxide mineral of the oxides and hydroxides group. Iron oxides (*i.e.*, hematite, goethite) occur, at least in small amounts, in nearly all soils (Dixon *et al.*, 1989). Hematite is a widespread mineral occurring in a great variety of soils as a result of the weathering of Fe-containing minerals (Dixon *et al.*, 1989). Igneous rocks (*i.e.*, granite, trachyte, and rhyolite) can contain primary accessory grains of hematite. This mineral was chosen for its high weatherability, its high content of iron and the presence of hematite as secondary minerals in the experimental site

where was isolated the strain PMB3(1) (Calvaruso *et al.*, 2009). The hematite chemical composition was determined on crushed powder by inductively coupled plasma-atomic emission spectrometry (700 Series ICP-OES, Agilent Technologies) after alkaline fusion in LiBO₂ and in HNO₃. It reveals that hematite crystals are pure at 99.3% (Fe₂O₃), contain in small amounts of 0.40% TiO₂, 0.18% SiO₂, 0.16% Al₂O₃, 0.10% MgO, 0.037% MnO and have a loss on ignition of 0%.

Mineral weathering assay

The assay was performed in glass tubes containing 2 g/l of sterile hematite and 10 ml of ABm medium devoid of iron. Before introduction of hematite, the glass tubes were rinsed with hydrochloric acid (HCl, 3.6 %) and MilliQ water. The tubes containing the culture medium and hematite were then sterilised by autoclaving at 121°C. For the weathering assay, 100 µl of each bacterial inoculum (described above; WT and ΔNRPS mutant strains) were used to inoculate the sterile glass tubes. Non-inoculated media with and without hematite were used as controls. After seven days of incubation at 25 °C (200 rpm), 200 µl of supernatant were sampled and the OD at 595 nm was measured to determine bacterial growth. Then, 1 ml of supernatant was centrifuged at 11,000 g for 15 min to remove bacterial cells. Quantification of the iron released from hematite in the culture supernatant as well as the pH were determined by adding 180 µl of supernatant of each culture with 20 µl of ferrospectral or bromocresol green (1 g/l), respectively (Uroz *et al.*, 2007). The absorbance of these suspensions was measured at 595 nm. The same culture supernatant was also used to measure siderophore production with the liquid CAS assay. The average values for three independent replicates for growth, iron quantification, pH and siderophore production were used to determine the weathering potential of the ΔNRPS mutant and the wild-type strains.

Bioinformatic analyses

Genome properties gene localization and homology

Genome analysis was performed using NCBI and MaGe (Vallenet, 2006). Homology search analysis and alignment were performed with BLAST (BlastN and BlastP) (Altschul *et al.*, 1990).

In silico search and identification of NRPS genes.

An *in silico* survey was done on the genome sequence of strain PMB3(1) to identify the conserved domains of NRPS involved in siderophore production using antiSMASH (Blin *et al.*,

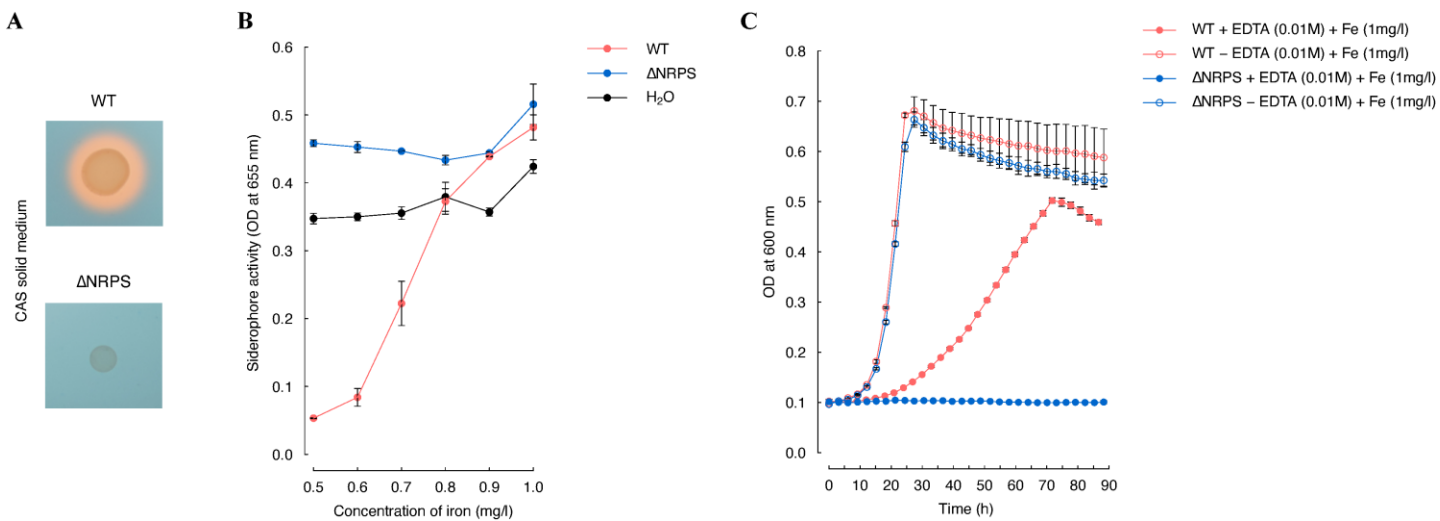


Figure 1: Impact of increasing concentrations of iron on chelating and growth abilities.

Siderophore activity: A. The *Collimonas pratensis* strain PMB3(1) WT (top) and its Δ NRPS mutant (bottom) were incubated for 3 days at 25°C on CAS solid medium. The presence of a siderophore activity is determined by the production of yellow halo around the colony. B. To determine the concentration of iron inhibiting siderophore production, liquid cultures of WT (red) and Δ NRPS (blue) were performed with different concentrations of iron (i.e., 0.5; 0.6; 0.7; 0.8; 0.9; 1.0 mg L⁻¹). Pure water (black) was used as a negative control. After 3 days, the absorbance at 655 nm was measured. The absorbance measured at 655 nm detects blue colour, yellow colour (corresponding to siderophore activity) will result of a decrease of the absorbance measured. Growth assay: C. The growth of the WT strain (red) and Δ NRPS mutant (blue) was monitored in presence (full circle) or absence (empty circle) of EDTA (10 mM) and with iron (1 mg L⁻¹) in AB medium (2 g L⁻¹ mannitol). The growth was performed under orbital shaking at 25C for 90 h. The absorbance was measured at 600 nm every 3 h. Each dot is the mean of independent triplicates.



Figure 2: Organization of the genomic region involved in the biosynthesis of siderophore in *Collimonas pratensis* strain PMB3(1).

Each wide arrow represents one gene and the size is according to the gene length. Gene annotation is shown under each gene and the complete description is provided in Table 1. Fine grey arrows represent promoters. Thin black arrows represent *mbaF*-dependent promoters with specific 35 and 10 regions (TAAA/n(17)/CGTC; Thomas, 2007). The purple gene encodes a putative sigma regulation factor. Green genes are responsible for the siderophore biosynthesis and the two NRPS genes are specifically represented in red. The blue genes are involved in the siderophore utilization and transport. The two white genes have unknown function in siderophore biosynthesis or utilization, and represent potential accessory genes involved in siderophore production. The little red arrow in the *mbaA* gene indicates the *SmaI* restriction site used for the insertion of the gentamycin resistance cassette to create the Δ NRPS mutant.

2019). A combination of 3 tools based on the Stachelhaus code of the adenylation domain was used to predict the amino acids recruited and the potential structure of the siderophore produced (NRPS predictor (Rausch, 2005); PKS/NRPS Analysis (Ansari *et al.*, 2004); NP.searcher (Li *et al.*, 2009)).

Phylogenetic analysis on Collimonas genus

As the MbaA protein is involved in the synthesis of the most variable part (*i.e.* N-terminal part) of the siderophore, a phylogenetic analysis was performed on it (Franke *et al.*, 2015). A total of 52 NRPS protein sequences were used to build a phylogenetic PhyML tree with Seaview (version 4.5.4; (Gouy *et al.*, 2010)). These sequences were chosen for their similarity to OrbI or MbaA proteins that are NRPS responsible of ornibactin or malleobactin biosynthesis, respectively. Our analysis includes sequences from *Collimonas* genera available online and other *Collimonas* related genera (*i.e.* *Paraburkholderia*, *Burkholderia*, *Caballeronia*, *Herbaspirillum*) for which the siderophores produced were predicted or experimentally demonstrated (Table S1). As *Collimonas* is strongly related to *Herbaspirillum*, the NRPS protein involved in serobactin production by *Herbaspirillum seropedicae* was included (Rosconi *et al.*, 2013).

Statistical analyses.

Statistical analyses were performed in R software. Data shown were means of at least triplicates. Differences between sample's means were analysed by ANOVA and TukeyHSD tests.

Nucleotide sequence accession number.

The whole-genome is available on NCBI under the accession no. WXXL01000000.

RESULTS

Identification of a genomic region involved in siderophore production

The CAS plate assay revealed that the model *Collimonas pratensis* strain PMB3(1) produced chelating molecules as shown by the development of a yellow halo around the colony (Fig. 1A). To identify the genomic region potentially involved in the production of chelators in strain PMB3(1), an antiSMASH search was performed on the genome sequence. Such analysis identified 11 regions encoding putative polyketide synthases (PKS; n=2) or Non-Ribosomal Peptide Synthetases (NRPS; n=9) with prediction or not of the final product (Table S2). Among the potential NRPS, only one was predicted as encoding a siderophore. This region large of 27.7 kb is characterized by 13 genes (Fig. 2; Table 2). Six genes are involved in siderophore

Table 2: Description of the NRPS region involved in siderophore production by *Collimonas pratensis* strain PMB3(1).

Each gene of the region of interest is presented with its NCBI accession number. Both MaGe and NCBI annotations are displayed. The putative function of each gene is indicated by a colour code [regulation (purple); siderophore biogenesis (green) including NRPS (red); transport and utilization of the siderophore (blue); unknown function (grey)]. * percentage of homology evaluated with BLASTN tool.

Putative function	Accession number	Length (pb)	Gene	MaGe	NCBI analyses	% identity *	
				Annotation	Annotation		
●	NKI69287.1	651	<i>mbaF</i>	DNA-directed RNA polymerase specialized sigma subunit, sigma24-like protein	DNA-directed RNA polymerase specialized sigma subunit, sigma24-like protein	77%	<i>Collimonas fungivorans</i> Ter331
●	NKI69288.1	309	<i>mbaG</i>	putative MbtH-like domain	putative MbtH-like domain	81%	<i>Collimonas sp.</i> MPS11E8
●	NKI69289.1	1023	<i>mbaH</i>	putative taurine catabolism dioxygenase TauD/F	putative taurine catabolism dioxygenase TauD/F	92%	<i>Collimonas sp.</i> MPS11E8
●	NKI69290.1	876	<i>mbaI</i>	putative siderophore transport system ATP-binding protein YusV	ABC cobalamin/Fe3+-siderophores transporter, ATPase subunit	81%	<i>Collimonas fungivorans</i> Ter331
●	NKI69291.1	2094	<i>mbaJ</i>	putative iron-hydroxamate transporter permease subunit	Fe(3+)-hydroxamate ABC transporter permease FhuB	79%	<i>Burkholderia sp.</i> K24
●	NKI69292.1	813	<i>mbaK</i>	Ferric reductase	siderophore-iron reductase FhuF	71%	<i>Collimonas sp.</i> OK412
●	NKI69293.1	1014	<i>mbaL</i>	putative iron compound ABC transporter	putative iron compound ABC transporter	86%	<i>Collimonas sp.</i> MPS11E8
●	NKI69294.1	1746	<i>mbaN</i>	ABC-type siderophore export system, fused ATPase and permease components	cyclic peptide export ABC transporter	93%	<i>Collimonas sp.</i> OK412
●	NKI69295.1	9666	<i>mbaA</i>	Non-ribosomal peptide synthetase module	non-ribosomal peptide synthase domain TIGR01720/amino acid adenylation domain-containing protein	79%	<i>Collimonas sp.</i> OK412
●	NKI69296.1	5076	<i>mbaB</i>	putative NRPS amino acid adenylation domain	putative NRPS amino acid adenylation domain	84%	<i>Collimonas sp.</i> MPS11E8
●	NKI69297.1	1374	<i>mbaC</i>	L-ornithine 5-monoxygenase	putative L-ornithin-5-monoxygenase	96%	<i>Collimonas sp.</i> MPS11E8
●	NKI69298.1	2220	<i>mbaD</i>	putative TonB-dependent siderophore receptor	putative TonB-dependent siderophore receptor, partial	96%	<i>Collimonas sp.</i> MPS11E8
●	NKI69299.1	822	<i>mbaE</i>	N(5)-hydroxyornithine formyltransferase, PvdF-type	N(5)-hydroxyornithine transformylase, PvdF-type xanthine	89%	<i>Collimonas sp.</i> OK412
●	NKI69300.1	2358	<i>iorB</i>	Isoquinoline 1-oxidoreductase beta subunit	dehydrogenase family protein molybdopterin-binding subunit	95%	<i>Collimonas sp.</i> PA-H2
●	NKI69301.1	465	<i>iorA</i>	Isoquinoline 1-oxidoreductase subunit alpha	(2Fe-2S)-binding protein	99%	<i>Collimonas sp.</i> PA-H2

biogenesis. Among them the larger genes *mbaA* and *mbaB* encode Non-ribosomal peptide synthetase (NRPS) composed of modules which including domains (Condensation, Adenylation, Thiolation). In addition, the region is characterized by 6 genes involved in siderophore transport and utilization and by one gene encoding a sigma factor.

Prediction of the siderophore structure

To predict the structure of the siderophore, the two NRPS encoding genes (*mbaA* NKI69295.1 and *mbaB* NKI69296.1) were submitted to NRPS prediction using three different tools. All predictions identified four biosynthetic modules, three were encoded by the *mbaA* gene and the last one by the *mbaB* gene. Modules are composed of different domains: adenylation (A), thiolation (T), condensation (C) and epimerization (E) following the schema (AT)-(CATE)-(CAT)-(CATC) for modules 1-2-3-4 respectively. The NRPS prediction tools also proposed the amino acid composition of the siderophore based on the Stachelhaus code (Stachelhaus *et al.*, 1999). For modules 2 and 3, the three NRPS prediction tools proposed the same amino acids. Module 2 corresponds to a surfactin synthetase B (75 % identity) that recruits an aspartate (Asp). Module 3 has 100 % identity with a pyoverdinin synthetase that recruits a serine (Ser). No consensus was obtained for modules 1 and 4. Indeed, the signature sequence (DVETLGGISK or DVETLGGI) identified for module 1 indicated the recruitment of beta-hydroxy-tyrosine according to 'NRPS predictor 2' or an ornithine according to 'NP.searcher'. For the amino acid recruited by the module 4, the signature sequence was DGEYTGGITK or DGEYTGGI. Such sequence is predicted to recruit a leucine according to 'NRPS predictor 2' and 'NP.searcher', or an ornithine according to 'PKS/NRPS analysis'. Altogether, our bioinformatics analyses predicted a siderophore composed of four amino acids, the second being a serine and the third an aspartate (X-Ser-Asp-X).

Involvement of the *mbaA* gene in the production of siderophore

To demonstrate the involvement of this NRPS encoding region in siderophore synthesis, a *mbaA* mutant named Δ NRPS was constructed and tested using different bioassays (*i.e.*, siderophore production, growth assay).

Regarding the ability to chelate iron, the WT strain of PMB3(1) was able to mobilize iron in the CAS plate assay after 3 days. The yellow halo formed around the colonies (WT colony diameter: 1.0 ± 0.1 cm) was about 1.5 ± 0.1 cm, while no halo was observed for the Δ NRPS mutant strain (Δ NRPS colony diameter: 0.6 ± 0.1 cm) (Fig. 1A). The production of chelating agent by the WT strain was also confirmed in liquid CAS assay where the absorbance in absence of iron in the culture medium is significantly decreased (OD at 655 nm = 0.053 ± 0.001)

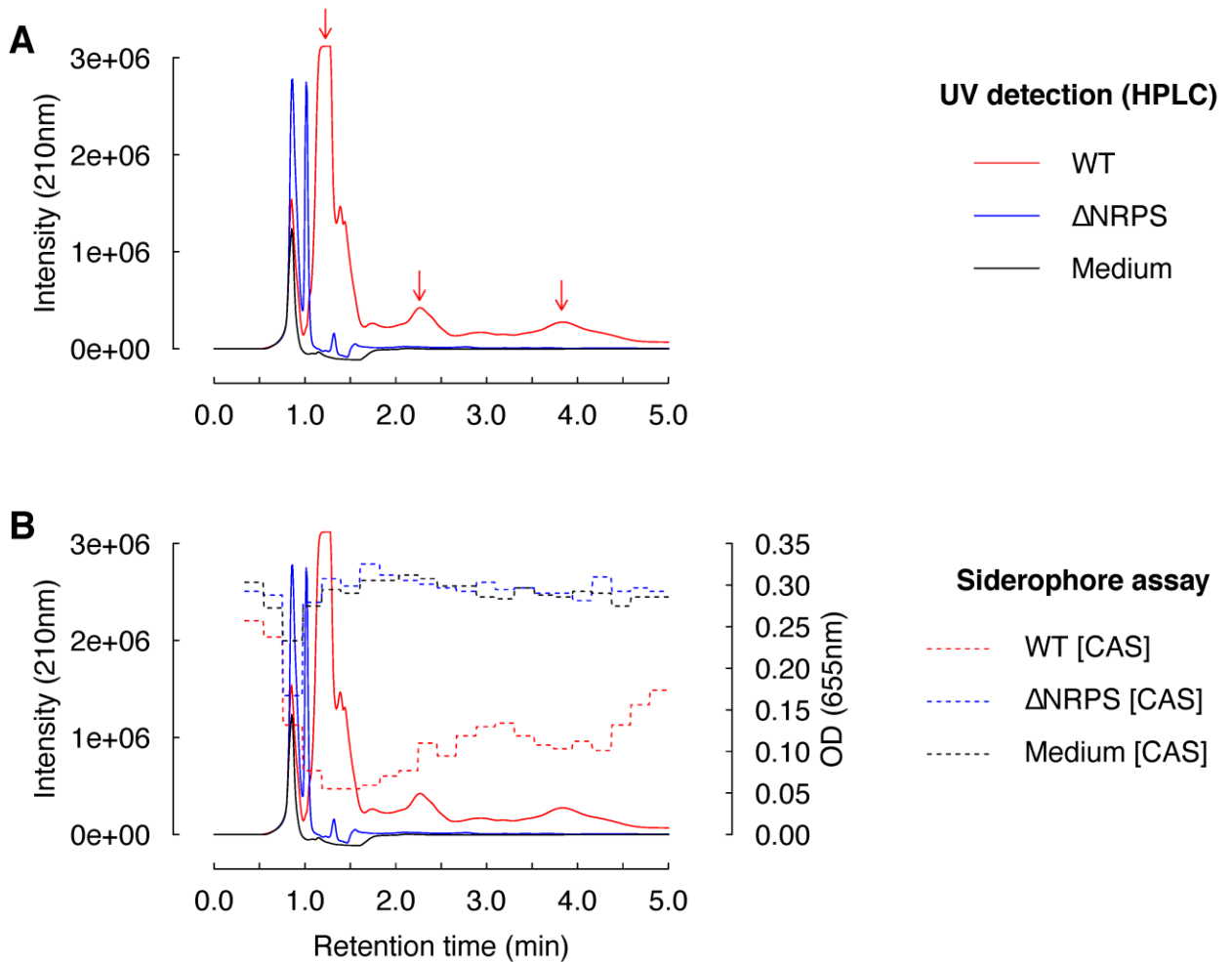


Figure 3: HPLC analysis and determination of the siderophore activity in the fractions collected.

A. HPLC analysis and UV detection. Products analysis of the pre-purified supernatant of the WT strain (red), Δ NRPS mutant (blue) and non-inoculated medium (black) were monitored at 210 nm after HPLC separation using a Milli-Q water/acetonitrile gradient for 40 min at 1 ml min⁻¹. A major peak at 1.2 min retention time and two smaller peaks at 2.2 and 3.8 min retention time were detected in the supernatant of the WT strain. These three peaks are highlighted by red arrows. B. Overlay of the HPLC and CAS analyses. To determine the presence of a siderophore activity, fractions were collected during the HPLC run and tested using the liquid CAS assay (activity level on the right axis). The HPLC spectra of the WT strain (red line; left axis), the mutant Δ NRPS (blue line; left axis) and the medium (black line; left axis) were overlaid with the siderophore activity measured by the CAS test on the fractions for the WT strain (red dotted line; right axis), the mutant Δ NRPS (blue dotted line; right axis) and the medium (black dotted line; right axis).

compared to the control. Noticeably, for the WT strain, a siderophore activity was observed for iron concentration ranging from 0 to 0.7 mg/l, while the production of chelator is inhibited for greater values (iron concentration of 0.8 mg/l: OD at 655 nm = 0.372 ± 0.019 ; $P < 0.05$) (Fig. 1B). Whatever the iron concentration, the Δ NRPS mutant did not present a chelating activity (OD at 655 nm = 0.458 ± 0.005) (Fig. 1B).

Impact of the mbaA mutation on growth

To determine how the concentration of iron and the mutation of the *mbaA* gene (Δ NRPS mutant) affect the growth of strain PMB3(1), were performed tests in medium containing increasing concentrations of iron (*i.e.* 0.1; 0.2; 0.3; 0.5; 1.0 mg/l). In this way, we demonstrated that the growth rate increased with increasing concentrations of iron and that strain PMB3(1) and its Δ NRPS mutant presented the same growth rate ($P > 0.05$) (Fig. S1). With 1 mg/l of iron, the growth rates of the Δ NRPS mutant and WT strains without EDTA were ca 0.06 ± 0.005 h⁻¹. However, in presence of EDTA (10 mM), no growth was observed for the Δ NRPS mutant while the growth of the WT strain was maintained, but its growth rate decreased to 0.01 ± 0.005 h⁻¹ (Fig. 1C).

Purification of the siderophore and chemical characterization

To determine the structure of the synthesized siderophore, the supernatants of 3-days old cultures in ABm devoid of iron of the WT strain (containing the siderophore), the Δ NRPS mutant strain and the medium were analysed by HPLC and LC-ESI-MS (or MS/MS).

The HPLC chromatograms of the WT, Δ NRPS mutant and medium supernatants are presented in figure 3A. Such analysis evidenced a major peak with a retention time (RT) of 1.2 min only present for the WT strain and absent from the two other conditions. To investigate the potential presence of a siderophore activity associated to this peak, the collected HPLC fractions were tested with the liquid CAS assay. Both HPLC chromatogram and siderophore activity were overlaid and are presented in figure 3B. Noticeably, the CAS assay revealed a strong reduction of the absorbance (OD_{655nm} = 0.055) for the fractions corresponding to the peak present at RT = 1.2 min, matching with the yellow color observed with the CAS assay. This confirmed the presence of a chelating activity in the first peak. In addition, two other peaks were detected for the WT strain at 2.2 (peak 2) and 3.8 (peak 3) min RT (Fig. 3A). The liquid CAS assay revealed a decrease of absorbance (OD_{655nm} = 0.110 and 0.103 for peak 2 and 3, respectively; Fig. 3B) after 1h incubation, suggesting the presence of a chelating activity in the two peaks.

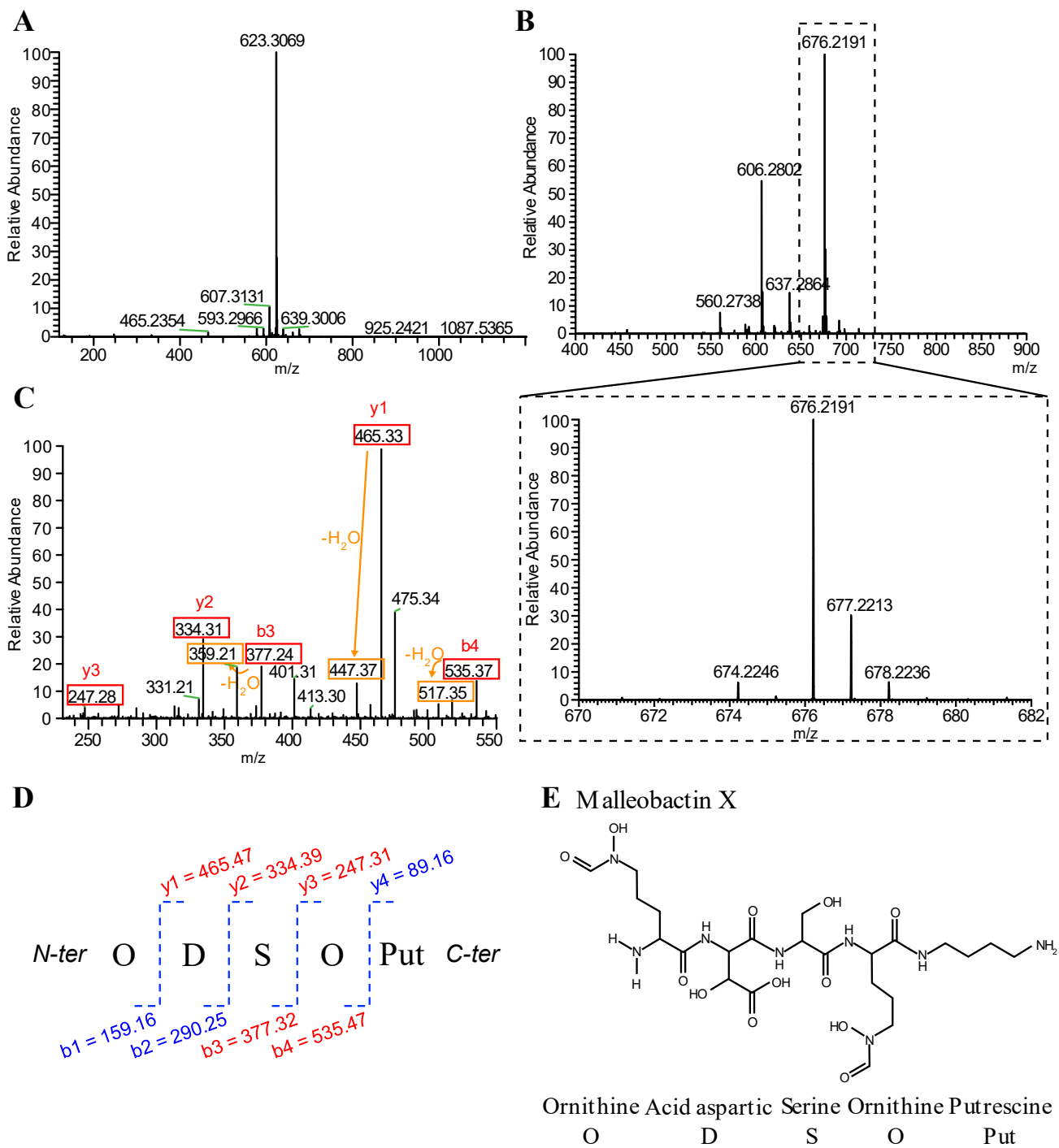


Figure 4: Chemical characterization of siderophore and ferrosiderophore.

ESI+-HRMS analysis of the fraction collected at 1.2 min (after HPLC purification) from the crude extract of the WT strain was performed. **A**. Without prior incubation with iron, the spectrum shows a major signal at $m/z = 623.3069$ (mono-protonated ion $[M + H]^+$) which indicates a siderophore exact mass of $MS = 622.3069$. **B**. After prior incubation with iron, the analysis reveals a major signal at $m/z = 676.2191$ (mono-protonated ion $[M + H]^+$) which indicates a ferrosiderophore exact mass of $MFS = 675.2191$. The isotopic pattern detailed in the dashed inset shows the obvious presence of an iron atom in the structure, thanks to the clear contributions of ^{54}Fe and ^{56}Fe (i.e., $m/z = 674.2246$ with 5.7% ratio and $m/z = 676.2191$ respectively). **C**. MS/MS spectrum. The previously highlighted siderophore compound ($MS = 622.3069$) was further analysed by ESI-MS/MS to validate its structure. m/z values framed in red correspond to theoretical fragments consecutive to breaking of the peptide bonds of the expected siderophore (m/z values framed in orange correspond to the dehydrated forms). **D**. Theoretical structure and fragmentation of malleobactin X. Each letter represents the amino acid letter code forming the malleobactin X (ornithin (O); acid aspartic (D); serine (S) and putrescine (Put)). The cleavage of the different peptide bonds (blue dashed lines) results in the formation of different ions containing the N-terminus of the peptide (b) and to ions containing the C-terminus of the peptide (y). Depending on the peptide bond cleaved, different fragments can be formed and their mass is presented as $b(1,2,3,4)$ and $y(1,2,3,4)$. The fragments identified experimentally (see panel C), which mass corresponds to the theoretical masses, are presented in red, the other are presented in blue. **E**. Structure and composition of the malleobactin X. The molecule represented corresponds to the reference malleobactin X predicted by Vargas-Straube *et al.* (2016). The name of each amino acid is written in full under the molecule as well as its one letter abbreviation.

A deeper analysis was done by liquid chromatography coupled to positive ion-mode electrospray mass spectrometry (LC-ESI⁺-HRMS) on the first peak collected to perform the chemical characterization on a fraction which chelating activity was demonstrated. High resolution MS analysis revealed that the siderophore compound (S) has an exact mass of $M_S = 622.3069$ (monoprotonated ion seen at $m/z = 623.3069$) (Fig. 4A). This value is strictly similar to the mass of the malleobactin X (Fig. 4E). To confirm the malleobactin X structure, the siderophore was further analyzed by tandem mass spectrometry (MS/MS) and the major product ions (Fig. 4C) compared with theoretical fragments (Fig. 4D). Product ion at $m/z = 535.4$ (Fig. 4C; b4) was attributed to the initial loss of C-terminal putrescine from the precursor ion and that at $m/z = 517.4$ to additional dehydration (H_2O loss from $m/z = 535.4$). Product ion at $m/z = 465.3$ (also seen in its dehydrated form at $m/z = 447.4$) (Fig. 4C; y1) was attributed to the initial loss of N-terminal ornithine from the precursor ion. The breaking of the peptide bond between serine and ornithine gave rise to a product ion at $m/z = 377.2$ (also seen in its dehydrated form at $m/z = 359.2$) (Fig. 4C; b3) and another product ion at $m/z = 247.3$ (Fig. 4C; y3). The breaking between aspartate and serine gave rise to a product ion at $m/z = 334.3$ (Fig. 4C; y2).

An additional LC-ESI⁺-HRMS analysis was performed on the same fraction (collected at RT = 1.2 min), but previously incubated with iron (see details in *Ferrisiderophore preparation* section). As presented on Figure 4B, formation of the expected ferrisiderophore (FS) was confirmed through the clear observation of the ion at $m/z = 676.2191$ ($M_{FS (exp)} = 675.2191$). This experimental value is in full agreement with the complexation between iron (55.935 u for major isotope ⁵⁶Fe) and the triply deprotonated siderophore S ($622.3069 - 3 \times 1.008 = 619.2829$ u), leading to a theoretical mass $M_{FS (theo)} = 675.2179$ ($55.935 + 619.2829$). The presence of iron in the structure was also validated by the detection of the characteristic isotopic pattern detailed in Figure 4B, showing clearly the contributions of ⁵⁴Fe and ⁵⁶Fe isotopes ($m/z = 674.2246$ and 676.2191 , respectively). In addition, the relative intensities of the ions at $m/z = 677.2213$ (28.8 %) and at $m/z = 678.2236$ (4.4 %) were found to be in perfect accordance with the predicted isotopic distribution for malleobactin (Manura and Manura, 2015). The MS/MS analysis conducted on the ferrisiderophore FS (fragmentation of the ion at $m/z = 676.2$) revealed a product ion at $m/z = 588.3$ explained by the loss of C-terminal putrescine (dehydrated form also seen at $m/z = 570.2$) (Fig. S2). A second intense ion at $m/z = 606.2802$ was also observed on Figure 4B, in addition to that attributed to the ferrisiderophore FS ($m/z = 676.2191$).

The experimental masses found for the siderophore S (without incubation with iron) and for the ferrisiderophore FS (after incubation of the siderophore with iron) agree with the results

a : Deng *et al.* 2017
 b : Meyer *et al.* 1995
 c : Esmaeel *et al.* 2016
 d : Darling *et al.* 1998
 e : Holden *et al.* 2009
 f : Schwager *et al.* 2013
 g : Alice *et al.* 2006
 h : Franke *et al.* 2013
 i : Vargas-Straube *et al.* 2016
 j : Esmaeel *et al.* 2018
 k : Song *et al.* 2015
 l : this study
 m : Rosconi *et al.* 2013

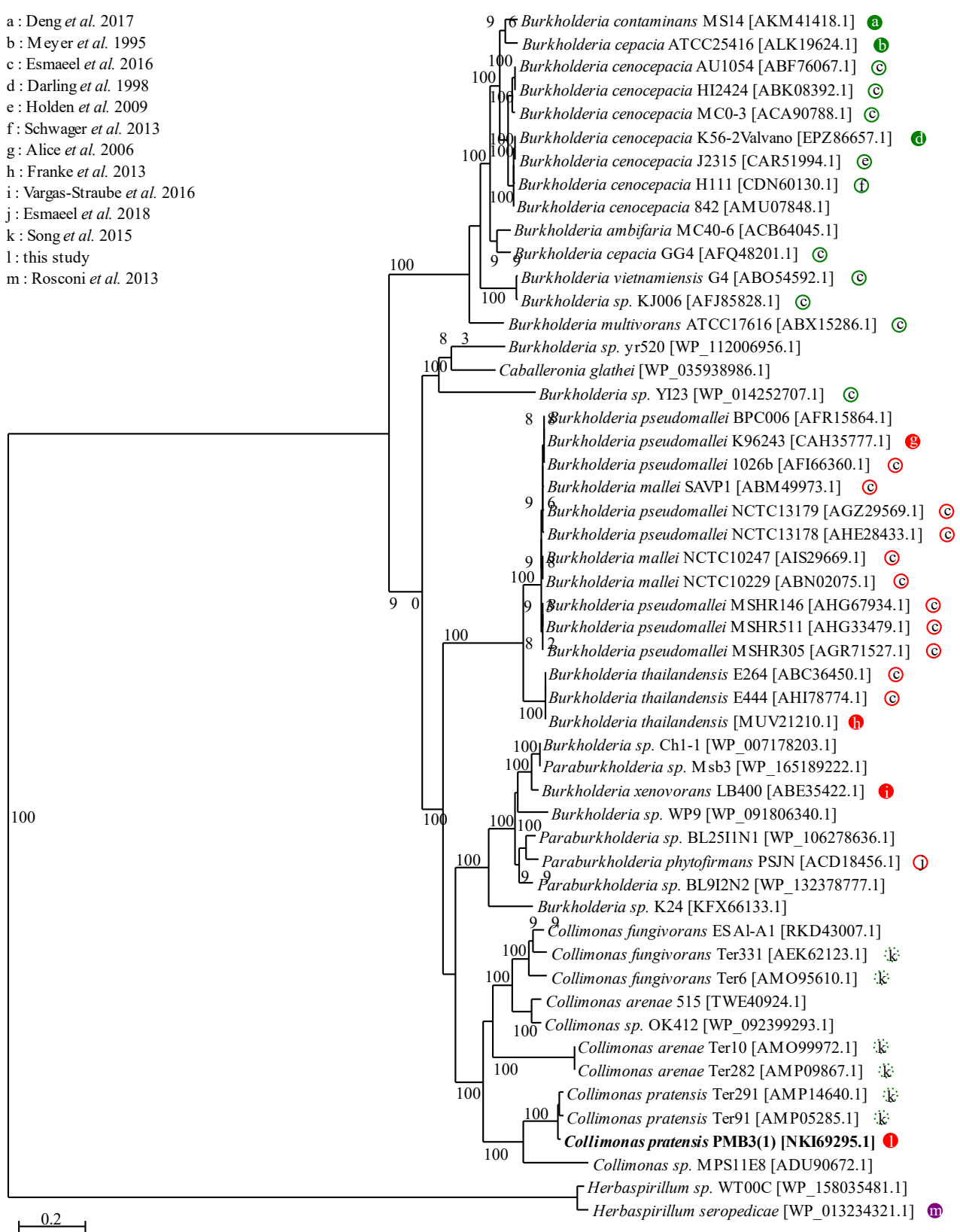


Figure 5: Phylogenetic tree based on the NRPS MbaA protein.

The conservation of the protein MbaA among *Collimonas* and other related genera (*Paraburkholderia*, *Burkholderia*, *Caballeronia*, *Herbaspirillum*) is presented on this phylogenetic tree. A set of 52 NRPS protein sequences was analysed and is detailed in the Table S1. Our model strain *Collimonas pratensis* PMB3(1) is in bold. The distribution and relatedness to known NRPS types is indicated by a colour code: ornibactin (i.e., Orbi-like protein: green circles), malleobactin (i.e., MbaA-like protein; red circles) or serobactin (purple circle). The MbaA homologues for which production of such siderophore was experimentally demonstrated or only predicted are presented with full circles and empty circles respectively. The production of ornibactin have been experimentally demonstrated for three strains included in the analysis (full green circles; Meyer *et al.*, 1995; Darling *et al.*, 1998; Deng *et al.*, 2017). Malleobactin was identified in three strains included in the analysis (full red circles; Alice *et al.*, 2006; Franke *et al.*, 2013; Vargas-Straube *et al.*, 2016). The other proteins considered in this analysis had only predicted function (empty circles; Holden *et al.*, 2009; Schwager *et al.*, 2013; Song *et al.*, 2015; Esmaeel *et al.*, 2016, 2018). The siderophores predicted as ornibactin and discussed in this study are represented by green dotted circles. Letters inside circles correspond to the cited reference (in the figure) in which the prediction or demonstration was/were done.

previously obtained on *Burkholderia xenovorans* strain LB400 (Vargas-Straube *et al.*, 2016), allowing us to clearly identify the malleobactin X as the siderophore produced by strain PMB3(1).

Comparison with other Collimonas and related genera

Our phylogenetic analysis revealed a good differentiation of the NRPS proteins according to the chemical structure of the siderophores (Fig. 5; green, ornibactin; red, malleobactin), the taxonomic belonging and the MbaA protein sequence. Beside the serobactin-related cluster, two clusters can be identified. The cluster 1 is supported by NRPS sequences (*i.e.*, OrbI homologues) assigned to *Burkholderia cepacia*, *B. cenocepacia* or *B. vietnamiensis* and is predicted to produce ornibactin. Noticeably, the production of ornibactin was experimentally demonstrated for three strains (*B. contaminans* MS14 (Deng *et al.*, 2017), *B. cenocepacia* K56-2 (Darling *et al.*, 1998), *B. cepacia* ATCC25416 (Meyer *et al.*, 1995)) of this cluster. The second cluster is composed of NRPS sequences (*i.e.*, MbaA homologues) assigned to *Burkholderia pseudomallei*, *B. mallei*, *B. thailandensis* and *Collimonas* and predicted to produce ornibactin or malleobactin. In this cluster, the production of malleobactin was experimentally demonstrated for three strains (*B. pseudomallei* K96243 (Alice *et al.*, 2006), *B. thailandensis* (Franke *et al.*, 2013), *B. xenovorans* LB400 (Vargas-Straube *et al.*, 2016)), while the production of ornibactin was only predicted. The strain PMB3(1) represents the fourth strains in this cluster which malleobactin production was experimentally demonstrated and the first collimonads. The strong proximity between the MbaA protein of the collimonads, the ability of strain PMB3(1) to produce malleobactin and the conserved ability to mobilize iron in collimonads suggest that all the collimonads considered synthesize malleobactin and not ornibactin as previously predicted (Fig. 5, green dotted circle; (Song *et al.*, 2015). Noticeably, the most distantly related sequence (38.25% of identity) to MbaA of strain PMB3(1) is the NRPS protein responsible of the biosynthesis of serobactin in *Herbaspirillum seropedicae* that is however the closest genus of *Collimonas* according to taxonomy (Rosconi *et al.*, 2013).

Siderophore involvement in hematite weathering

To evaluate the potential involvement of the siderophore produced by *Collimonas* strain PMB3(1) on mineral weathering, a hematite dissolution experiment was performed (Fig. 6). To exclude an acidification effect, the experiment was done with mannitol as sole carbon source, which was previously shown not to lead to the acidification of the medium during growth (Uroz *et al.*, 2009b). After 7-days of incubation, the iron released in solution from hematite as well as

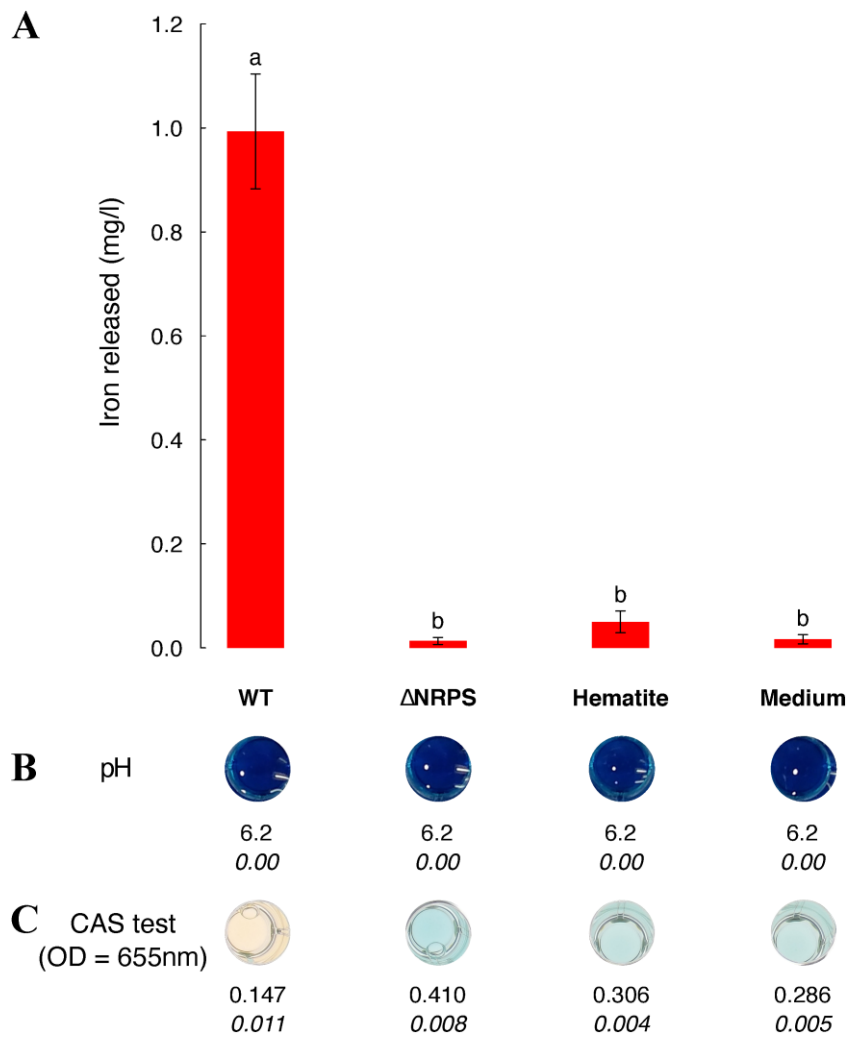


Figure 6: Determination of the weathering ability of the WT *Collimonas pratensis* strain PMB3(1) and its ΔNRPS mutant.

The hematite weathering potential of strain PMB3(1) and its ΔNRPS mutant was evaluated by the measure of iron released from hematite in ABm medium devoid of iron, after 7 days of incubation at 25 °C under agitation (200 rpm). Non-inoculated media with and without hematite (termed Hematite and Medium respectively) were used as control. **A.** Quantity of iron released in solution. The iron released from hematite was measured by ferrospectral determination (optical density measured at 595 nm). A standard calibration of iron (FeCl_3) was used to calculate the iron concentration of the different samples tested (WT, ΔNRPS, Hematite alone or Medium alone). Samples with the same letter indicate no significant difference ($P < 0.05$). **B.** pH of the supernatant. The acidification of the medium was measured by absorbance at 595 nm using the bromocresol green method. **C.** Siderophore activity. The siderophore activity of the different samples was determined using the CAS method. The yellow colour indicates a siderophore activity. For each measure, data are presented under the corresponding pictures and are the mean of independent triplicates; the standard deviation is indicated in italic.

the pH were measured, permitting to monitor the mineral weathering potential of the different strains tested. In this experiment, no significant growth difference was observed between the Δ NRPS mutant and the WT strains ($OD_{595nm} = 0.8 \pm 0.1$; $P < 0.05$), though the WT strain released significantly more iron from the mineral (0.99 ± 0.19 mg/l; Fig. 6) than the Δ NRPS mutant strain or the non-inoculated controls (*i.e.* 0.01 ± 0.01 mg/l; $P < 0.05$). Noticeably, the pH of the medium remained stable at 6.2 whatever the treatment (inoculated with the WT strain, inoculated with the Δ NRPS mutant strain and non-inoculated controls). In this sense, the CAS assay performed on the supernatant for each condition demonstrated a siderophore activity (yellow colour) only for the WT strain (Fig. 6).

DISCUSSION

The high effectiveness of *Collimonas pratensis* strain PMB3(1) to weather mineral led us to investigate in more details the molecular mechanisms involved. In a previous study, we showed that the mineral weathering effectiveness of this strain was related to the carbon substrate used (*i.e.*, glucose, mannitol, trehalose, gluconate; (Uroz *et al.*, 2009b)). In presence of glucose this strain strongly acidified the medium and effectively weathers minerals, through the production of protons and gluconic acids (Picard *et al.*, 2021). Noticeably, the strain PMB3(1) appeared also capable of weathering minerals in presence of mannitol, a sugar highly produced by mycorrhizal fungi and metabolized by this bacterial strain through a moderately-acidifying pathway. The mineral weathering ability observed with mannitol suggests the existence of alternative MW mechanisms such as iron acquisition systems. In this study, we investigated the mechanisms by which this strain was able to mobilize iron from artificial (*i.e.*, CAS) or natural iron complexes (*i.e.*, hematite). The *in silico* analyses revealed that the genome of strain PMB3(1) harbors the *ftrABCD* system (siderophore-independent iron uptake system; (Mathew *et al.*, 2014): [NKI69657.1-NKI69654.1]), the bacterioferritin (iron storage protein; (Andrews, 1998): [NKI72009.1- NKI72013.1]), the *fecIR* operon ((Braun *et al.*, 2003): [NKI68784.1-NKI68785.1]), and an incomplete *hmu* operon ((Nienaber *et al.*, 2002); only *hmuU* [NKI72430.1] and *hmuV* [NKI72429.1] were identified). In addition, an antiSMASH analysis identified a NRPS cluster, predicted to synthesize a siderophore (*i.e.*, ornibactin). The presence in this strain of all these iron acquisition systems suggests that it is quite adapted to the nutrient-poor conditions occurring in the soil where it was isolated, but may also reflect the competition for iron occurring in the mycorrhizosphere with other bacteria and fungi.

Although, strain PMB3(1) possesses all these putative iron acquisition systems, the knock-out of a single gene of the NRPS cluster fully abolished its ability to mobilize iron as seen using the CAS assay. These results suggest that the other iron acquisition systems play a minor role in comparison to the production of siderophores or that they are important in other processes such as the mobilization of intracellular iron reserves. The NRPS region detected in strain PMB3(1) presents the classical structure found in other bacterial species producing NRPS-dependent siderophores with the identification of genes involved in siderophore biogenesis (including the 2 NRPS genes), in siderophore transport and utilization (Fig. 2; (Esmael *et al.*, 2016, 2018; Butt and Thomas, 2017)). Noticeably, the *mbaA* and *mbaB* genes coding for siderophore production presented 36 % identity with genes *mbaA* and *mbaB* of *B. xenovorans* LB400, a strain capable of chelating iron and producing malleobactin (Vargas-Straube *et al.*, 2016). Different homologues of enzymes involved in N- and C-terminal modifications during siderophore production were also detected. These included *mbaH* which encodes a taurine dioxygenase TauD/F involved in the modifications on the N-terminal ornithine (Franke *et al.*, 2013), *mbaC* which encodes a L-ornithine 5-monooxygenase involved in the formation of a nitrogroup (Franke *et al.*, 2013) and *mbaE* encoding a N(5)-hydroxyornithine transformylase PvdF-type involved in modifications of the C-terminal ornithine (McMorran *et al.*, 2001; Vargas-Straube *et al.*, 2016). The *mbaI*, *J*, *L*, *N* and *D* genes involved in the ferrisiderophore complex recognition and transport were also identified (Butt and Thomas, 2017). In addition, the enzyme in charge of the reduction of the ferrisiderophore and of the release of Fe²⁺ and siderophore in the cytoplasm was identified as the *mbaK* gene encoding a siderophore-iron reductase FhuF (Matzanke *et al.*, 2004). The *mbaF* gene responsible of the siderophore expression and regulation was also identified as well as *mbaF*-dependent promoters with specific -35 and -10 regions (TAAA/n(17)/CGTC) (Agnoli *et al.*, 2006; Thomas, 2007). Last, two genes (*iorA*, *iorB*) were identified at the end of the siderophore biosynthesis region. They are predicted to encode two subunits of an aldehyde dehydrogenase responsible of the formation of a carboxyl group. This function may be responsible of modifications occurring after the synthesis of the siderophore. However, a Δ IorB mutant presented no differences in siderophore mass ($M_s = 622.3069$) or in its chelating activity compared to the WT strain (data not shown). A comparison with all the other available collimonads genomes revealed a good conservation of the NRPS regions as well as of the *iorAB* genes. Indeed, the complete NRPS region was found in nine of the 14 genomes and was absent from the other five (*Collimonas sp.* OK242; *Collimonas sp.* OK307; *Collimonas sp.* OK607; *Collimonas sp.* PA-H2 and *Collimonas arenae* Cal35). A more in-depth analysis of the genomes of these collimonads revealed that some of

them possessed genes involved in the synthesis of other siderophores predicted to be myxochelin (41% of homology for strains Cal35 and PA-H2) or staphylobactin (18% of homology for strains OK242 and OK307). No siderophore region was detected for strain OK607. These results suggest that malleobactin may not be the sole siderophore produced by collimonads.

The combination of HPLC, fraction collect and mass spectrometry allowed us to identify the siderophore produced by *Collimonas pratensis* strain PMB3(1) as malleobactin. This hydroxamate type siderophore was reported for the first time to be produced by *Pseudomonas pseudomallei* (reclassified as *Burkholderia pseudomallei*) hence its name (Yang *et al.*, 1991). To date, different forms of malleobactin have been discovered in different *Burkholderia* and *Paraburkholderia* species, be they members or not of the *Burkholderia cepacia* complex (Bcc) (*i.e.* most pathogenic *Burkholderia*) (Esmaeel *et al.*, 2016). In our study, the ESI-MS analysis revealed that the major metabolite in the purified extract (*i.e.*, peak 1 with RT=1.2 min) had an exact mass of $M_s = 622.3069$ and $m/z = 623.3069$ without iron and of $M_{FS} = 675.2191$ with iron (Fig. 4B). This compound effectively chelated iron as stated with the CAS assay. This mass value obtained with iron corresponds perfectly with the mass of the malleobactin previously identified in the strains *Burkholderia xenovorans* LB400 (Vargas-Straube *et al.*, 2016) and *Burkholderia thailandensis* (Franke *et al.*, 2013). In both studies, the molecule detected was named malleobactin, but Vargas-Straube *et al.* (2016) proposed the name malleobactin X and Franke *et al.* (2013) proposed malleobactin B. The single difference between malleobactins B and X is the position of an aldehyde group on the N-terminal ornithine. Such position was predicted by Vargas-Straube *et al.*, (2016) to be on the second nitrogen of the N-ter ornithine, while Franke *et al.*, (2013) determined it by NMR to be on the first nitrogen of the N-ter ornithine. As the two molecules present the same properties (*i.e.*, mass, fragmentation peaks, chelation ability) and the genome sequences are quite similar, malleobactin B and X may correspond to the same molecule. For clarity in the text we used the term malleobactin X. Finally, Vargas-Straube *et al.* (2016) also identified another compound in the MS spectrum of the malleobactin produced by *B. xenovorans* LB400 presenting a peak at $m/z = 606.4$ that they hypothesized to be a fragment of the ferrisiderophore produced by a McLafferty rearrangement (elimination of $\text{CH}_2\text{CHCH}_2\text{CH}_2\text{NH}_2$ corresponding to $[\text{M}_{FS}-70]^+$), but without the demonstration of the presence of iron in this compound. For our strain PMB3(1) of *Collimonas*, we detected a similar compound ($m/z = 606.2802$) in the MS spectrum of the ferrisiderophore (*i.e.*, malleobactin + Fe). However, the isotopic profile of this ion ($m/z = 606.2802$) did not

present the characteristic iron signature, *i.e.* the clear contributions of the two major iron isotopes ^{54}Fe and ^{56}Fe (Fig.S3). The absence of iron signal indicates that the $m/z = 606.2802$ molecule is consequently not the result of a Mc Lafferty rearrangement of the ferrisiderophore.

The chemical analyses granted us the possibility to authenticate two other minor peaks (2 and 3; Fig. 3) in the purified extract, far less intense than the peak 1 corresponding to malleobactin (RT = 1.2 min). The absence of these two peaks in the HPLC chromatogram of the extract of the ΔNRPS mutant (Fig. 3A) demonstrated that the NRPS region we identified was responsible for the synthesis of (at least) the three molecules (corresponding to the main peak 1 and the minor peaks 2 and 3). Interestingly, the production of three different malleobactins by a single NRPS region was also proposed for *Burkholderia pseudomallei* strain K96243, but the exact structure and identity of these malleobactins were not reported (Alice *et al.*, 2006). In the current work, we show that these two other molecules presented a lower chelating activity than the main molecule we identified as malleobactin X. This is not incongruent with these molecules being malleobactins. In fact, among the wide range of malleobactins described (malleobactin A-H and X; (Franke *et al.*, 2015; Vargas-Straube *et al.*, 2016), the affinity for iron strongly varies. Some of them (*i.e.* malleobactin B, F and H) present such a low chelating activity compared to malleobactin E that their real role in cell has been questioned (Franke *et al.*, 2015). Thus diversity of malleobactin forms was proposed to result from the low specificity of the adenylation domain A1 and A4 of the NRPS modules (Misiak *et al.*, 2011; Franke *et al.*, 2015), but also from a spontaneous structural change (Franke *et al.*, 2013). Noticeably, malleobactin B (similar to malleobactin X) was shown to undergo such a structural change to other malleobactin forms (A, C or D) without any enzyme activity (Franke *et al.*, 2013). Comparing the affinity for iron of these different forms revealed that malleobactin A has a very low affinity. Based on the literature, our observations suggest that the two minor peaks (2 and 3) represent alternate structures of the main malleobactin detected in peak 1. However, due to their low concentration and low affinity for iron, we were not able to determine their mass.

While the chemical characterization of the siderophore produced by strain PMB3(1) allowed the identification of a malleobactin, the bioinformatic analyses done on the NRPS genomic sequence (antiSMASH) predicted the production of ornibactin (Stephan *et al.*, 1993). This discrepancy is mostly explained by the antiSMASH database that does not contain malleobactin standard regions as few malleobactins have been characterized at both chemical and genomic levels. The comparison of the chemical structures of ornibactin and malleobactin reveals that

they are strongly similar (Alice *et al.*, 2006; Deng *et al.*, 2017). Indeed, the two siderophores differ only on the N-terminal ornithine residue, where an aliphatic chain is present only on ornibactin (Franke *et al.*, 2013). Such similarities suggest that the two siderophores are encoded by very similar NRPS systems and that many predicted ornibactin-producing bacteria may be malleobactin producers. To solve this issue of identification, Esmaeel *et al.* (2016) proposed to add new criteria to differentiate the NRPS-encoding ornibactin and malleobactin based on particular genes present or absent in the NRPS clusters (Esmaeel *et al.*, 2016). They suggested that *orbK*-like and *orbL*-like genes (encoding acetylases) are only present in ornibactin clusters, whereas the presence of *mbaM* gene (encoding a protein of unknown function) was only present in malleobactin clusters (Esmaeel *et al.*, 2016). However, the presence of the *mbaM* gene was only highlighted for Burkholderiales (Butt and Thomas, 2017). In our study, we do not detect a *mbaM* homologue in our model strain nor in the other *Collimonas* strains or in *Burkholderia xenovorans* strain LB400, indicating that this protein is not necessary for malleobactin production and is not a good marker of the malleobactin cluster. The absence of the *orbK*-like and *orbL*-like genes are therefore the most relevant for the identification of the malleobactin cluster.

Siderophores represent one of the main class of molecules reported to play an important role in mineral weathering which are frequently detected in soil (Holmström *et al.*, 2004). They are suspected to act directly on the mineral surfaces where they form iron-siderophore complexes that are then transferred into the soil solution (Kalinowski *et al.*, 2000; Kraemer, 2004). They may also indirectly act in MW by chelating the iron released in solution, a phenomenon that modifies the equilibrium of the surrounding solution and thus enhances mineral dissolution. While the effect of pure molecules was clearly evidenced, the experiments done with bacteria producing such molecules were less clear. Indeed, concomitantly to the production of siderophores, many bacteria acidify their environment, making it difficult to disentangle the relative effects of the acidification and the chelating molecules in the mineral weathering process (Hersman *et al.*, 1995; Holmén and Casey, 1996; Maurice, 2000). Furthermore, several studies have shown a synergistic effect of siderophores and acidifying molecules on mineral weathering (Reichard *et al.*, 2007; Dehner *et al.*, 2010; Lin *et al.*, 2018). Controlling the pH of the solution is therefore essential at chemical, mineralogical and microbiological levels. First, it conditions the activity of the siderophores. Deferrioxamine B, protochelin or rhizoferrin clearly showed contrasted chelating activity with pH (Akafia *et al.*, 2014). Second, acidic conditions allow a spontaneous dissolution of minerals (Brantley, 2008), which may release

significant quantities of iron in solution and consequently inhibit siderophore production by bacteria. Indeed, the production of siderophore was shown to be inhibited by iron concentrations ranging from 0.2 to 5 mg/l (Dave and Dubc, 2000; Deng *et al.*, 2017) or in presence of Fe-bearing glasses (Perez *et al.*, 2019). In our study, the production of malleobactin by strain PMB3(1) appeared inhibited from 0.8 mg/l of iron in the solution, while the amount of iron released passively in solution from hematite in our experimental conditions was below 0.1 mg/l. To exclude a potential effect of acidification, our mineral weathering experiments were performed in a buffered medium (constant pH = 6.2), devoid of iron and containing a carbon source (*i.e.* mannitol), which does not permit an acidifying metabolism. Using this approach, we were able to demonstrate for the first time that malleobactin production by *Collimonas pratensis* strain PMB3(1) contribute to a significant increase of the hematite dissolution as showed by comparing the WT and Δ NRPS mutant strains. Together, our results suggest that depending on the availability of carbon substrates (*i.e.*, glucose vs mannitol) and the nutrients (*i.e.*, quantity of iron in solution), strain PMB3(1) may use high levels of organic acid such as gluconate and 2-keto-gluconate or malleobactin to weather minerals and to scavenge iron from its surrounding environment, two mechanisms which can act independently or in a synergistic way (Picard *et al.*, 2021).

CONCLUSION

The combination of molecular and chemical methods allowed us to identify the siderophore produced by *Collimonas pratensis* strain PMB3(1) as malleobactin X. This is the first chemical and molecular characterization of a siderophore produced by a collimonads as previous studies were only based on *in silico* analyses which predicted that the siderophore produced by *Collimonas* was ornibactin (Song *et al.*, 2015). Malleobactin is a hydroxamate type siderophore characterized by a large diversity of structures that was previously reported in Burkholderiales and for several strains of *Burkholderia*. The conservation of the NRPS region among *Collimonas* species and the ability of the related strains to mobilize iron indicate that the production of malleobactin is a common trait among collimonads. It would be interesting to extend such analysis to a broader number of collimonads and neighboring genera. This study is also the first one demonstrating that malleobactin production is involved in mineral weathering. The use of a non-acidifying C source and of buffered conditions clearly proved the impact of malleobactin on the dissolution of hematite. Although malleobactin impacted hematite, a highly weatherable iron oxide, its impact on primary minerals present in soils such as phyllosilicate remains to be tested.

ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by grants from the EC2CO program of the CNRS to S.U. and P.O. L.P. was also supported by a fellowship from the French Ministère de l'Enseignement Supérieur, de la Recherche et de l'Innovation. The UMR1136 and UR1138 are supported by the ANR through the Laboratory of Excellence Arbre (ANR-11-LABX-0002-01).

REFERENCES

- Agnoli, K., Lowe, C.A., Farmer, K.L., Husnain, S.I., and Thomas, M.S. (2006) The ornibactin biosynthesis and transport genes of *Burkholderia cenocepacia* are regulated by an extracytoplasmic function factor which is a part of the Fur regulon. *J Bacteriol* **188**: 3631–3644.
- Akafia, M.M., Harrington, J.M., Bargar, J.R., and Duckworth, O.W. (2014) Metal oxyhydroxide dissolution as promoted by structurally diverse siderophores and oxalate. *Geochim Cosmochim Acta* **141**: 258–269.
- Alice, A.F., Lopez, C.S., Lowe, C.A., Ledesma, M.A., and Crosa, J.H. (2006) Genetic and transcriptional analysis of the siderophore malleobactin biosynthesis and transport genes in the human pathogen *Burkholderia pseudomallei* K96243. *J Bacteriol* **188**: 1551–1566.
- Altschul, S.F., Gish, W., Miller, W., Myers, E.W., and Lipman, D.J. (1990) Basic Local Alignment Search Tool. *J Mol Biol* **215**: 403–410.
- Andrews, S.C. (1998) *Advances in microbial physiology*, San Diego, Calif.; London: Academic.
- Ansari, Mohd.Z., Yadav, G., Gokhale, R.S., and Mohanty, D. (2004) NRPS-PKS: a knowledge-based resource for analysis of NRPS/PKS megasynthases. *Nucleic Acids Res* **32**: W405–W413.
- Ballhausen, M.-B., Vandamme, P., and de Boer, W. (2016) Trait differentiation within the fungus-feeding (mycophagous) bacterial genus *Collimonas*. *PLOS ONE* **11**: e0157552.
- Blin, K., Shaw, S., Steinke, K., Villebro, R., Ziemert, N., Lee, S.Y., et al. (2019) antiSMASH 5.0: updates to the secondary metabolite genome mining pipeline. *Nucleic Acids Res* **47**: W81–W87.
- Brantley, S.L. (2008) Kinetics of Mineral Dissolution. In *Kinetics of Water-Rock Interaction*. Brantley, S.L., Kubicki, J.D., and White, A.F. (eds). New York, NY: Springer, pp. 151–210.

- Braun, V., Mahren, S., and Ogierman, M. (2003) Regulation of the FecI-type ECF sigma factor by transmembrane signalling. *Curr Opin Microbiol* **6**: 173–180.
- Butaité, E., Baumgartner, M., Wyder, S., and Kümmerli, R. (2017) Siderophore cheating and cheating resistance shape competition for iron in soil and freshwater *Pseudomonas* communities. *Nat Commun* **8**: 414.
- Butt, A.T. and Thomas, M.S. (2017) Iron acquisition mechanisms and their role in the virulence of *Burkholderia* species. *Front Cell Infect Microbiol* **7**..
- Calvaruso, C., Mareschal, L., Turpault, M.-P., and Leclerc, E. (2009) Rapid clay weathering in the rhizosphere of norway spruce and oak in an acid forest ecosystem. *Soil Sci Soc Am J* **73**: 331–338.
- Calvaruso, C., Turpault, M.-P., Leclerc, E., and Frey-Klett, P. (2007) Impact of ectomycorrhizosphere on the functional diversity of soil bacterial and fungal communities from a forest stand in relation to nutrient mobilization processes. *Microb Ecol* **54**: 567–577.
- Chilton, M.-D., Currier, T.C., Farrand, S.K., Bendich, A.J., Gordon, M.P., and Nester, E.W. (1974) *Agrobacterium tumefaciens* DNA and PS8 bacteriophage DNA not detected in crown gall tumors. *Proc Natl Acad Sci* **71**: 3672–3676.
- Darling, P., Chan, M., Cox, A.D., and Sokol, P.A. (1998) Siderophore production by cystic fibrosis isolates of *Burkholderia cepacia*. *Infect Immun* **66**: 874–877.
- Dave, B.P. and Dubc, H.C. (2000) Regulation of siderophore production by iron Fe(III) in certain fungi and fluorescent pseudomonads. *Indian J Exp Biol* **38**: 297–299.
- De Boer, W. (2004) *Collimonas fungivorans* gen. nov., sp. nov., a chitinolytic soil bacterium with the ability to grow on living fungal hyphae. *Int J Syst Evol Microbiol* **54**: 857–864.
- Dehner, C.A., Awaya, J.D., Maurice, P.A., and DuBois, J.L. (2010) Roles of siderophores, oxalate, and ascorbate in mobilization of iron from hematite by the aerobic bacterium *Pseudomonas mendocina*. *Appl Environ Microbiol* **76**: 2041–2048.
- Deng, P., Foxfire, A., Xu, J., Baird, S.M., Jia, J., Delgado, K.H., et al. (2017) The siderophore product ornibactin Is required for the bactericidal activity of *Burkholderia contaminans* MS14. *Appl Environ Microbiol* **83**..
- Dixon, J.B., Weed, S.B., and Dinauer, R.C. eds. (1989) Minerals in soil environments, 2nd ed. Madison, Wis., USA: Soil Science Society of America.
- Doan, H.K., Maharaj, N.N., Kelly, K.N., Miyao, E.M., Davis, R.M., and Leveau, J.H.J. (2020) Antimycotal activity of *Collimonas* isolates and synergy-based biological control of *Fusarium* wilt of tomato. *Phytobiomes J* **4**: 64–74.

- Dong, H. (2010) Mineral-microbe interactions: a review. *Front Earth Sci China* **4**: 127–147.
- Esmael, Q., Miotto, L., Rondeau, M., Leclère, V., Clément, C., Jacquard, C., et al. (2018) *Paraburkholderia phytofirmans* PsJN-plants interaction: from perception to the induced mechanisms. *Front Microbiol* **9**: 2093.
- Esmael, Q., Pupin, M., Kieu, N.P., Chataigné, G., Béchet, M., Derauel, J., et al. (2016) *Burkholderia* genome mining for nonribosomal peptide synthetases reveals a great potential for novel siderophores and lipopeptides synthesis. *MicrobiologyOpen* **5**: 512–526.
- Franke, J., Ishida, K., and Hertweck, C. (2015) Plasticity of the malleobactin pathway and its impact on siderophore action in human pathogenic bacteria. *Chem - Eur J* **21**: 8010–8014.
- Franke, J., Ishida, K., Ishida-Ito, M., and Hertweck, C. (2013) Nitro versus hydroxamate in siderophores of pathogenic bacteria: effect of missing hydroxylamine protection in malleobactin biosynthesis. *Angew Chem Int Ed* **52**: 8271–8275.
- Gouy, M., Guindon, S., and Gascuel, O. (2010) SeaView version 4: A multiplatform graphical user interface for sequence alignment and phylogenetic tree building. *Mol Biol Evol* **27**: 221–224.
- Hernandez, M.E., Kappler, A., and Newman, D.K. (2004) Phenazines and other redox-active antibiotics promote microbial mineral reduction. *Appl Environnemental Microbiol* **70**: 8.
- Hersman, L., Lloyd, T., and Sposito, G. (1995) Siderophore-promoted dissolution of hematite. *Geochim Cosmochim Acta* **59**: 3327–3330.
- Holden, M.T.G., Seth-Smith, H.M.B., Crossman, L.C., Sebahia, M., Bentley, S.D., Cerdeño-Tárraga, A.M., et al. (2009) The genome of *Burkholderia cenocepacia* J2315, an epidemic pathogen of cystic fibrosis patients. *J Bacteriol* **191**: 261–277.
- Holmén, B.A. and Casey, W.H. (1996) Hydroxamate ligands, surface chemistry, and the mechanism of ligand-promoted dissolution of goethite [α -FeOOH(s)]. *Geochim Cosmochim Acta* **60**: 4403–4416.
- Holmström, S.J.M., Lundström, U.S., Finlay, R.D., and van Hees, P.A.W. (2004) Siderophores in forest soil solution. *Biogeochemistry* **71**: 247–258.
- Hoppener-Ogawa, S., de Boer, W., Leveau, J.H.J., van Veen, J.A., de Brandt, E., Vanlaere, E., et al. (2008) *Collimonas arenae* sp. nov. and *Collimonas pratensis* sp. nov., isolated from (semi-)natural grassland soils. *Int J Syst Evol Microbiol* **58**: 414–419.

- Kalinowski, B.E., Liermann, L.J., Brantley, S.L., Barnes, A., and Pantano, C.G. (2000) X-ray photoelectron evidence for bacteria-enhanced dissolution of hornblende. *Geochim Cosmochim Acta* **64**: 1331–1343.
- Kamilova, F., Leveau, J.H.J., and Lugtenberg, B. (2007) *Collimonas fungivorans*, an unpredicted in vitro but efficient in vivo biocontrol agent for the suppression of tomato foot and root rot. *Environ Microbiol* **9**: 1597–1603.
- Koele, N., Turpault, M.-P., Hildebrand, E.E., Uroz, S., and Frey-Klett, P. (2009) Interactions between mycorrhizal fungi and mycorrhizosphere bacteria during mineral weathering: Budget analysis and bacterial quantification. *Soil Biol Biochem* **41**: 1935–1942.
- Kraemer, S.M. (2004) Iron oxide dissolution and solubility in the presence of siderophores. *Aquat Sci - Res Boundaries* **66**: 3–18.
- Lepleux, C., Turpault, M.P., Oger, P., Frey-Klett, P., and Uroz, S. (2012) Correlation of the abundance of betaproteobacteria on mineral surfaces with mineral weathering in forest soils. *Appl Environ Microbiol* **78**: 7114–7119.
- Leveau, J.H.J., Uroz, S., and de Boer, W. (2010) The bacterial genus *Collimonas* : mycophagy, weathering and other adaptive solutions to life in oligotrophic soil environments. *Environ Microbiol* **12**: 281–292.
- Li, M.H., Ung, P.M., Zajkowski, J., Garneau-Tsodikova, S., and Sherman, D.H. (2009) Automated genome mining for natural products. *BMC Bioinformatics* **10**: 185.
- Lin, Q., Wang, Y., Yang, X., Ruan, D., Wang, S., Wei, X., and Qiu, R. (2018) Effect of low-molecular-weight organic acids on hematite dissolution promoted by desferrioxamine B. *Environ Sci Pollut Res* **25**: 163–173.
- Lindsay, W.L. (1995) Chemical reactions in soils that affect iron availability to plants. A quantitative approach. In *Iron Nutrition in Soils and Plants*. Abadía, J. (ed). Dordrecht: Springer Netherlands, pp. 7–14.
- Manura, J.J. and Manura, D.J. (2015) Isotope Distribution Calculator and Mass Spec Plotter, Scientific Instrument Services (SIS).
- Mathew, A., Eberl, L., and Carlier, A.L. (2014) A novel siderophore-independent strategy of iron uptake in the genus *Burkholderia*: Siderophore-independent iron uptake in *Burkholderia*. *Mol Microbiol* **91**: 805–820.
- Matzanke, B.F., Anemüller, S., Schünemann, V., Trautwein, A.X., and Hantke, K. (2004) FhuF, part of a siderophore–reductase system †. *Biochemistry* **43**: 1386–1392.
- Maurice, P.A. (2000) Dissolution of Al-substituted goethites by an aerobic *Pseudomonas mendocina* var. bacteria. *Geochim Cosmochim Acta* **64**: 1363–1374.

- McMorran, B.J., Sullivan, K., and Lamont, I.L. (2001) Involvement of a transformylase enzyme in siderophore synthesis in *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbiology* 1517–1524.
- Meyer, J.-M., Van Van, T., Stintzi, A., Berge, O., and Winkelmann, G. (1995) Ornibactin production and transport properties in strains of *Burkholderia vietnamiensis* and *Burkholderia cepacia* (formerly *Pseudomonas cepacia*). *Biometals* **8**: 309–317.
- Misiek, M., Braesel, J., and Hoffmeister, D. (2011) Characterisation of the ArmA adenylation domain implies a more diverse secondary metabolism in the genus *Armillaria*. *Fungal Biol* **115**: 775–781.
- Nienaber, A., Hennecke, H., and Fischer, H.-M. (2002) Discovery of a haem uptake system in the soil bacterium *Bradyrhizobium japonicum*: Haem uptake system in *B. japonicum*. *Mol Microbiol* **41**: 787–800.
- Paris, C., Selmeczi, K., Ebel, B., Stefan, L., Csire, G., Cakir-Kiefer, C., et al. (2021) Metabolomics approach based on LC-HRMS for the fast screening of iron(II)-chelating peptides in protein hydrolysates. *Anal Bioanal Chem*.
- Parrello, D., Zegeye, A., Mustin, C., and Billard, P. (2016) Siderophore-mediated iron dissolution from nontronites is controlled by mineral crystallochemistry. *Front Microbiol* **7**:423.
- Perez, A., Rossano, S., Trcera, N., Verney-Carron, A., Rommevaux, C., Fourdrin, C., ... & Guyot, F. (2019). Direct and indirect impact of the bacterial strain *Pseudomonas aeruginosa* on the dissolution of synthetic Fe (III)-and Fe (II)-bearing basaltic glasses. *Chemical Geol*, 523: 9-18.
- Picard, L., Oger, P., Turpault, M.-P., and Uroz, S. (2020) Draft genome sequence of *Collimonas pratensis* strain PMB3(1), an effective mineral-weathering and chitin-hydrolyzing bacterial strain. *Microbiol Resour Announc* **9**: e00601-20, /mra/9/37/MRA.00601-20.atom.
- Picard, L., Turpault, M.-P., Oger, P.M., and Uroz, S. (2021) Identification of a novel type of glucose dehydrogenase involved in the mineral weathering ability of *Collimonas pratensis* strain PMB3(1). *FEMS Microbiol Ecol* fiae232.
- Pospiech, A. and Neumann, B. (1995) A versatile quick-prep of genomic DNA from gram-positive bacteria. *Trends Genet TIG* **11**: 217–218.
- Rausch, C. (2005) Specificity prediction of adenylation domains in nonribosomal peptide synthetases (NRPS) using transductive support vector machines (TSVMs). *Nucleic Acids Res* **33**: 5799–5808.

- Reichard, P.U., Kretzschmar, R., and Kraemer, S.M. (2007) Dissolution mechanisms of goethite in the presence of siderophores and organic acids. *Geochim Cosmochim Acta* **71**: 5635–5650.
- Rosconi, F., Davyt, D., Martínez, V., Martínez, M., Abin-Carriquiry, J.A., Zane, H., et al. (2013) Identification and structural characterization of serobactins, a suite of lipopeptide siderophores produced by the grass endophyte *Herbaspirillum seropedicae*: Siderophores of *Herbaspirillum seropedicae*. *Environ Microbiol* **15**: 916–927.
- Rout, G.R. and Sahoo, S. (2015) Role of iron in plant growth and metabolism. *Rev Agric Sci* **3**: 1–24.
- Schwager, S., Agnoli, K., Köthe, M., Feldmann, F., Givskov, M., Carlier, A., and Eberl, L. (2013) Identification of *Burkholderia cenocepacia* strain H111 virulence factors using nonmammalian infection hosts. *Infect Immun* **81**: 143–153.
- Schwyn, B. and Neilands, J.B. (1987) Universal chemical assay for the detection and determination of siderophores. *Anal Biochem* **160**: 47–56.
- Senechkin, I.V., van Overbeek, L.S., Er, H.L., de Vos, O., and van Bruggen, A.H.C. (2013) Interaction of *Collimonas* strain IS343 with *Rhizoctonia solani* at low carbon availability *in vitro* and in soil. *Eur J Plant Pathol* **136**: 789–802.
- Shirvani, M. and Nourbakhsh, F. (2010) Desferrioxamine-B adsorption to and iron dissolution from palygorskite and sepiolite. *Appl Clay Sci* **48**: 393–397.
- Song, C., Schmidt, R., de Jager, V., Krzyzanowska, D., Jongedijk, E., Cankar, K., et al. (2015) Exploring the genomic traits of fungus-feeding bacterial genus *Collimonas*. *BMC Genomics* **16**: 1103–1120.
- Stachelhaus, T., Mootz, H.D., and Marahiel, M.A. (1999) The specificity-conferring code of adenylation domains in nonribosomal peptide synthetases. *Chem Biol* **6**: 493–505.
- Stephan, H., Freund, S., Beck, W., Jung, G., Meyer, J.-M., and Winkelmann, G. (1993) Ornibactins? A new family of siderophores from *Pseudomonas*. *Biometals* **6**: 93–100.
- Thomas, M.S. (2007) Iron acquisition mechanisms of the *Burkholderia cepacia* complex. *BioMetals* **20**: 431–452.
- Uroz, S., Calvaruso, C., Turpault, M.-P., and Frey-Klett, P. (2009a) Mineral weathering by bacteria: ecology, actors and mechanisms. *Trends Microbiol* **17**: 378–387.
- Uroz, S., Calvaruso, C., Turpault, M.-P., Pierrat, J.C., Mustin, C., and Frey-Klett, P. (2007) Effect of the mycorrhizosphere on the genotypic and metabolic diversity of the bacterial communities Involved in mineral weathering in a forest soil. *Appl Environ Microbiol* **73**: 3019–3027.

- Uroz, S., Calvaruso, C., Turpault, M.-P., Sarniguet, A., de Boer, W., Leveau, J.H.J., and Frey-Klett, P. (2009b) Efficient mineral weathering is a distinctive functional trait of the bacterial genus *Collimonas*. *Soil Biol Biochem* **41**: 2178–2186.
- Uroz, S., Kelly, L.C., Turpault, M.-P., Lepleux, C., and Frey-Klett, P. (2015) The mineralosphere concept: mineralogical control of the distribution and function of mineral-associated bacterial communities. *Trends Microbiol* **23**: 751–762.
- Uroz, S., Oger, P., Morin, E., and Frey-Klett, P. (2012) Distinct ectomycorrhizospheres share similar bacterial communities as revealed by pyrosequencing-based analysis of 16S rRNA genes. *Appl Environ Microbiol* **78**: 3020–3024.
- Uroz, S., Tech, J.J., Sawaya, N.A., Frey-Klett, P., and Leveau, J.H.J. (2014) Structure and function of bacterial communities in ageing soils: Insights from the Mendocino ecological staircase. *Soil Biol Biochem* **69**: 265–274.
- Vallenet, D. (2006) MaGe: a microbial genome annotation system supported by synteny results. *Nucleic Acids Res* **34**: 53–65.
- Vargas-Straube, M.J., Cámara, B., Tello, M., Montero-Silva, F., Cárdenas, F., and Seeger, M. (2016) Genetic and functional analysis of the biosynthesis of a Non-Ribosomal Peptide Siderophore in *Burkholderia xenovorans* LB400. *PLOS ONE* **11**: e0151273.
- Yang, H.M., Chaowagul, W., and Sokol, P.A. (1991) Siderophore production by *Pseudomonas pseudomallei*. *Infect Immun* **59**: 776–780.

SUPPORTING INFORMATION

Table S1: List of NRPS proteins used in the phylogenetic analysis

A total of 52 NRPS protein sequences synthesizing ornibactin (green), malleobactin (red) or serobactin (purple) were used in this study. Their corresponding strain is indicated as well as their putative function (NCBI annotation) and their NCBI accession number. We proposed to name proteins of the analysis according to literature and results of our study. If the chemical structure of the siderophore (*i.e.*, ornibactin, malleobactin or serobactin) produced has been experimentally verified, NRPS protein of the related strain is named OrbI (ornibactin; full green circle), MbaA (malleobactin; full red circle) or Ø (full purple circle) respectively. When the siderophore structure has only been predicted, NRPS protein is named OrbI-like (predicted as ornibactin; open green circle) or MbaA-like (predicted as malleobactin; open red circle) respectively. The siderophore predicted as ornibactin and discussed in this study are represented by green dotted circles.

Strain	NCBI annotation	Annotated protein from this study	NCBI accession number	Reference
<i>Burkholderia contaminans</i> MS14	cytochrome C peroxidase	● OrbI	AKM41418.1	Deng <i>et al.</i> 2017
<i>Burkholderia cepacia</i> ATCC25416	non-ribosomal peptide synthetase	● OrbI	ALK19624.1	Meyer <i>et al.</i> 1995
<i>Burkholderia cenocepacia</i> AU1054	amino acid adenylation	○ OrbI-like	ABF76067.1	Esmaeel <i>et al.</i> 2016
<i>Burkholderia cenocepacia</i> HI2424	amino acid adenylation domain protein	○ OrbI-like	ABK08392.1	Esmaeel <i>et al.</i> 2016
<i>Burkholderia cenocepacia</i> MC0-3	amino acid adenylation domain protein	○ OrbI-like	ACA90788.1	Esmaeel <i>et al.</i> 2016
<i>Burkholderia cenocepacia</i> K56-2Valvano	siderophore malleobactin non-ribosomal peptide synthetase MbaJ	● OrbI	EPZ86657.1	Darling <i>et al.</i> 1998
<i>Burkholderia cenocepacia</i> J2315	ornibactin biosynthesis non-ribosomal peptide synthase	○ OrbI-like	CAR51994.1	Holden <i>et al.</i> 2009
<i>Burkholderia cenocepacia</i> H111	non-ribosomal peptide synthetase modules	○ OrbI-like	CDN60130.1	Shwager <i>et al.</i> 2013

<i>Burkholderia cenocepacia</i> 842	non-ribosomal peptide synthetase	○	OrbI-like	AMU07848.1	
<i>Burkholderia ambifaria</i> MC40-6	amino acid adenylation domain protein	○	OrbI-like	ACB64045.1	
<i>Burkholderia cepacia</i> GG4	amino acid adenylation domain-containing protein	○	OrbI-like	AFQ48201.1	Esmaeel <i>et al.</i> 2016
<i>Burkholderia vietnamiensis</i> G4	amino acid adenylation domain protein	○	OrbI-like	ABO54592.1	Esmaeel <i>et al.</i> 2016
<i>Burkholderia sp.</i> KJ006	non-ribosomal peptide synthetase modules, pyoverdine	○	OrbI-like	AFJ85828.1	Esmaeel <i>et al.</i> 2016
<i>Burkholderia multivorans</i> ATCC17616	amino acid adenylation domain protein	○	OrbI-like	ABX15286.1	Esmaeel <i>et al.</i> 2016
<i>Burkholderia sp.</i> yr520	amino acid adenylation domain-containing protein	○	OrbI-like	WP_112006956.1	
<i>Caballeronia glathei</i>	non-ribosomal peptide synthetase	○	OrbI-like	WP_035938986.1	
<i>Burkholderia sp.</i> YI23	non-ribosomal peptide synthetase	○	OrbI-like	WP_014252707.1	Esmaeel <i>et al.</i> 2016
<i>Burkholderia pseudomallei</i> BPC006	putative siderophore non-ribosomal peptide synthetase MbaJ	○	MbaA-like	AFR15864.1	
<i>Burkholderia pseudomallei</i> K96243	putative siderophore related non-ribosomal peptide synthase	●	MbaA	CAH35777.1	Alice <i>et al.</i> 2006
<i>Burkholderia pseudomallei</i> 1026b	siderophore malleobactin non-ribosomal peptide synthetase MbaJ	○	MbaA-like	AFI66360.1	Esmaeel <i>et al.</i> 2016
<i>Burkholderia mallei</i> SAVP1	putative non-ribosomal peptide synthetase	○	MbaA-like	ABM49973.1	Esmaeel <i>et al.</i> 2016
<i>Burkholderia pseudomallei</i> NCTC13179	D-alanine--poly(phosphoribitol) ligase, subunit 1	○	MbaA-like	AGZ29569.1	Esmaeel <i>et al.</i> 2016
<i>Burkholderia pseudomallei</i> NCTC13178	D-alanine--poly(phosphoribitol) ligase, subunit 1	○	MbaA-like	AHE28433.1	Esmaeel <i>et al.</i> 2016
<i>Burkholderia mallei</i> NCTC10247	D-alanine--poly(phosphoribitol) ligase, subunit 1	○	MbaA-like	AIS29669.1	Esmaeel <i>et al.</i> 2016
<i>Burkholderia mallei</i> NCTC10229	putative non-ribosomal peptide synthetase	○	MbaA-like	ABN02075.1	Esmaeel <i>et al.</i> 2016
<i>Burkholderia pseudomallei</i> MSHR146	D-alanine--poly(phosphoribitol) ligase, subunit 1	○	MbaA-like	AHG67934.1	Esmaeel <i>et al.</i> 2016
<i>Burkholderia pseudomallei</i> MSHR511	D-alanine--poly(phosphoribitol) ligase, subunit 1	○	MbaA-like	AHG33479.1	Esmaeel <i>et al.</i> 2016

<i>Burkholderia pseudomallei</i> MSHR305	D-alanine--poly(phosphoribitol) ligase, subunit 1	○	MbaA-like	AGR71527.1	Esmaeel <i>et al.</i> 2016
<i>Burkholderia thailandensis</i> E264	peptide synthetase-like protein	○	MbaA-like	ABC36450.1	Esmaeel <i>et al.</i> 2016
<i>Burkholderia thailandensis</i> E444	D-alanine--poly(phosphoribitol) ligase, subunit 1	○	MbaA-like	AHI78774.1	Esmaeel <i>et al.</i> 2016
<i>Burkholderia thailandensis</i>	amino acid adenylation domain-containing protein	●	MbaA	MUV21210.1	Franke <i>et al.</i> 2013
<i>Burkholderia sp.</i> Ch1-1	non-ribosomal peptide synthetase	○	MbaA-like	WP_007178203.1	
<i>Paraburkholderia sp.</i> Msb3	amino acid adenylation domain-containing protein	○	MbaA-like	WP_165189222.1	
<i>Burkholderia xenovorans</i> LB400	non-ribosomal peptide synthase	●	MbaA	ABE35422.1	Vargas-Straube <i>et al.</i> 2016
<i>Burkholderia sp.</i> WP9	non-ribosomal peptide synthetase	○	MbaA-like	WP_091806340.1	
<i>Paraburkholderia sp.</i> BL2511N1	non-ribosomal peptide synthetase	○	MbaA-like	WP_106278636.1	
<i>Paraburkholderia phytofirmans</i> PSJN	amino acid adenylation domain protein	○	MbaA-like	ACD18456.1	Esmaeel <i>et al.</i> 2018
<i>Paraburkholderia sp.</i> BL9I2N2	amino acid adenylation domain-containing protein	○	MbaA-like	WP_132378777.1	
<i>Burkholderia sp.</i> K24	cytochrome C peroxidase	○	MbaA-like	KFX66133.1	
<i>Collimonas fungivorans</i> ES Al-A1	non-ribosomal peptide synthase protein (TIGR01720 family)/amino acid adenylation domain-containing protein	○	MbaA-like	RKD43007.1	
<i>Collimonas fungivorans</i> Ter331	non-ribosomal peptide synthetase module	⊗	OrbI-like	AEK62123.1	Song <i>et al.</i> 2015
<i>Collimonas fungivorans</i> Ter6	D-alanine--poly(phosphoribitol) ligase, subunit 1	⊗	OrbI-like	AMO95610.1	Song <i>et al.</i> 2015
<i>Collimonas arenae</i> 515	non-ribosomal peptide synthase protein (TIGR01720 family)/amino acid adenylation domain-containing protein	○	MbaA-like	TWE40924.1	
<i>Collimonas sp.</i> OK412	non-ribosomal peptide synthetase	○	MbaA-like	WP_092399293.1	








<i>Collimonas arenae</i> Ter10	D-alanine--poly(phosphoribitol) ligase, subunit 1		OrbI-like	AMO99972.1	Song <i>et al.</i> 2015
<i>Collimonas arenae</i> Ter282	D-alanine--poly(phosphoribitol) ligase, subunit 1		OrbI-like	AMP09867.1	Song <i>et al.</i> 2015
<i>Collimonas pratensis</i> Ter291	D-alanine--poly(phosphoribitol) ligase, subunit 1		OrbI-like	AMP14640.1	Song <i>et al.</i> 2015
<i>Collimonas pratensis</i> Ter91	D-alanine--poly(phosphoribitol) ligase, subunit 1		OrbI-like	AMP05285.1	Song <i>et al.</i> 2015
<i>Collimonas pratensis</i> PMB3(1)	amino acid adenylation domain-containing protein		MbaA	NKI69295.1	This study
<i>Collimonas sp.</i> MPS11E8	putative non-ribosomal peptide synthase		MbaA-like	ADU90672.1	
<i>Herbaspirillum sp.</i> WT00C	amino acid adenylation domain-containing protein			WP_158035481.1	
<i>Herbaspirillum seropedicae</i> Z67	non-ribosomal peptide synthetase		∅	WP_013234321.1	Rosconi <i>et al.</i> 2013

Table S2 : List of NRPS/PKS regions identified in *Collimonas pratensis* strain PMB3(1)

(see details of each cluster in the online version of this article at the publisher's web-site)

Cluster Id	Begin	End	Length	Region type	MIBiG	Completion	Product_predicted	Type
1	1580827	1635577	54751	NRPS	BGC0001721	0.867	Ornibactin	nrps
2	2244630	2285913	41284	PKS-like	BGC0001098	0.222	Iturin	nrps-transatpks
3	2360088	2392122	32035	NRPS	–	–	–	–
4	2392223	2394924	2702	NRPS	BGC0001758	1	Rhizomide A / rhizomide B / rhizomide C	nrps
5	2395025	2417533	22509	NRPS	BGC0000774	0.057	Lipopolysaccharide	saccharide
6	2680989	2723985	42997	NRPS-like	–	–	–	–
7	3792281	3814464	22184	T3PKS	BGC0001233	0.263	Feglymycin	nrps
8	5553998	5556883	2886	NRPS	–	–	–	–
9	5556984	5558971	1988	NRPS	BGC0001758	1	Rhizomide A / rhizomide B / rhizomide C	nrps
10	5571165	5572859	1695	NRPS-like	–	–	–	–
11	5574638	5575990	1353	NRPS-like	BGC0001135	1	Bicornutin	nrps

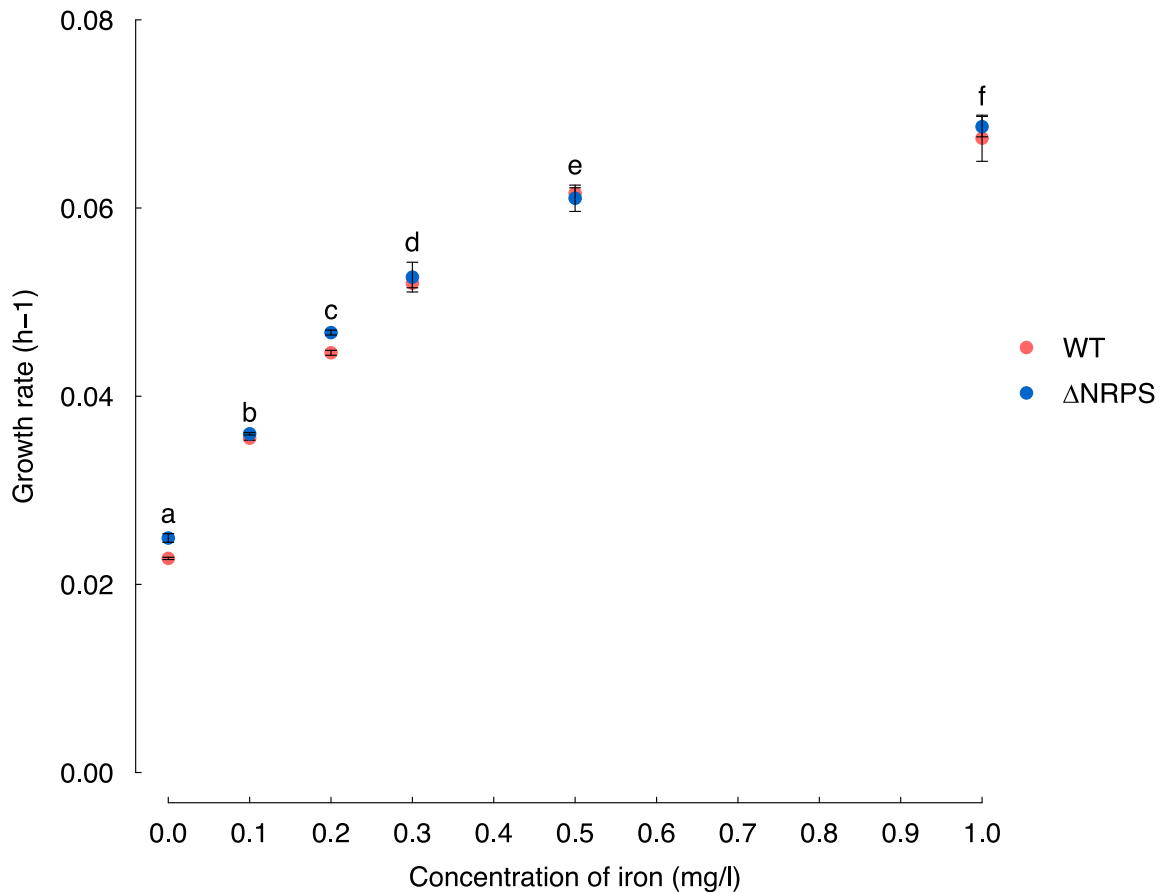


Figure S1: Evaluation of the growth of the WT and Δ NRPS mutant strains according to iron availability

The WT (red) and Δ NRPS mutant (blue) strains were incubated in ABm with various concentrations of iron ranging from 0 to 1 mg/l. To evaluate the growth in each condition, the slope of the exponential phase was calculated and termed growth rate (h^{-1}). The growth rate is reported as a function of the concentration of iron in the solution. Letters indicate significant differences of the growth rate according to iron concentrations ($P < 0.05$). No significant differences for the growth rate of WT and Δ NRPS mutant were observed.

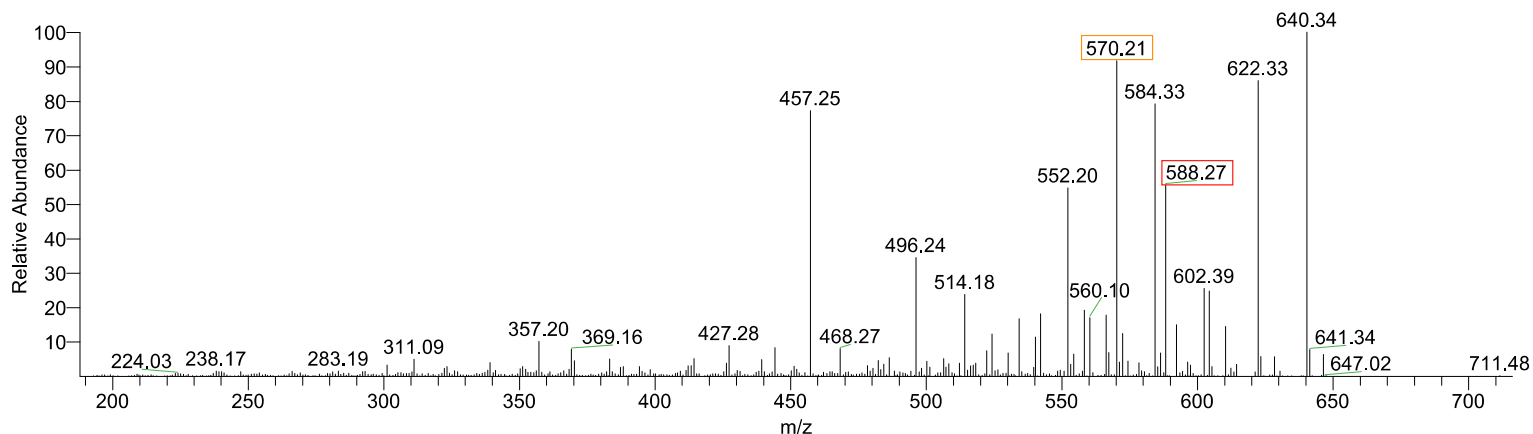


Figure S2: Fragmentation spectrum of the molecule at $m/z = 676$

The main molecule incubated with iron corresponding to a $m/z = 676.2191$ was further analyzed by ESI-MS/MS to determine its structure. Molecular weights framed in red correspond to the fragmentation of the molecule *via* the break of a peptide bound. The orange ones correspond to the mono-dehydrated form for each red-framed molecular peak (M-18).

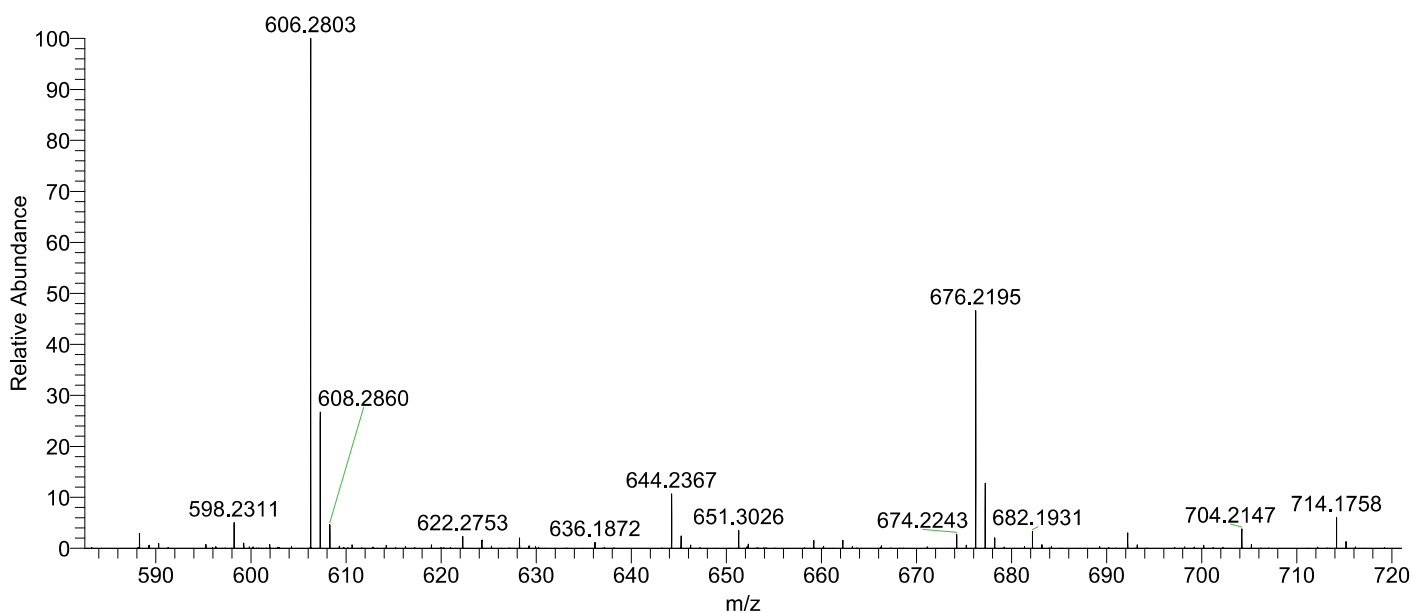


Figure S3: Isotopic profile of the unknown compound at $m/z = 606$

Mass spectrometry analysis of the fraction of interest from the crude extract of the WT strain (RT = 1.2 min) revealed, after incubation with iron, a second intense signal at $m/z = 606.2803$ (in addition to the main signal at $m/z = 676.2195$ attributed to the ferrosiderophore compound). The isotopic pattern of this ion indicates the absence of iron (no characteristic signal associated with ^{54}Fe), the corresponding compound can not be the result of a Mc Lafferty rearrangement of the ferrisiderophore.

CHAPITRE 4

Les mécanismes moléculaires impliqués dans l'altération des minéraux par *Collimonas pratensis* PMB3(1) sont-ils influencés par les facteurs intrinsèques et extrinsèques ?

1. Préambule

Les deux chapitres précédents ont permis d'identifier certains mécanismes moléculaires développés par la souche modèle *Collimonas pratensis* PMB3(1) pour altérer les minéraux. Dans nos conditions expérimentales, ces mécanismes semblent jouer un rôle essentiel. L'acidolyse implique une Glucose/Méthanol/Choline oxydoréductase (GMC) tandis que la complexolyse est liée à l'action d'un sidérophore, la malléobactine. Après ces premiers développements, la question qui s'est posée dans ma thèse a été de savoir si ces deux mécanismes ont la même efficacité face à différents types de minéraux (facteurs intrinsèques) et différentes conditions environnementales (facteurs extrinsèques) ? Pour répondre à cette question, une approche de mutagénèse couplée à des tests biotiques et abiotiques d'altération ont été réalisés.

CONTRIBUTION : Dans ce chapitre, j'ai participé au design expérimental, j'ai réalisé les expériences avec l'aide de Carine Cochet pour les analyses à la torche à plasma. J'ai également participé à la préparation des minéraux (l'olivine, l'hématite, le grenat et la biotite). J'ai analysé les résultats et l'article est en cours d'écriture.

2. Introduction

La dissolution des minéraux dépend de facteurs intrinsèques et extrinsèques (White and Buss, 2014). Les facteurs intrinsèques correspondent aux caractéristiques propres des minéraux (*i.e.*, composition chimique, structure cristalline, taille...). Les facteurs extrinsèques correspondent aux caractéristiques environnementales, que l'on peut diviser en différentes catégories selon leur origine : (i) abiotique (*i.e.*, pH, tampon, vent, eau (Hilley *et al.*, 2010), température (Bahr *et al.*, 1986; Hall *et al.*, 2008), gel (Matsuoka and Murton, 2008)...) et (ii) biotique (*i.e.*, plantes (Mottershead *et al.*, 2003), champignons (Jongmans *et al.*, 1997), et bactéries...).

Parmi cette composante biotique, de nombreuses souches bactériennes efficaces pour altérer les minéraux ont été isolées au niveau de la rhizosphère. Dans cet environnement, sous l'influence des racines, le glucose représente l'une des principales sources de carbohydrate retrouvée dans les sols forestiers et au niveau des exsudats racinaires (Grayston *et al.*, 1997; Jolivet *et al.*, 2006; Medeiros *et al.*, 2006). Dans les sols forestiers, les arbres sont majoritairement en symbiose avec les champignons mycorhiziens ; en conséquence, d'autres sources de carbone d'origine fongique peuvent être retrouvées parmi lesquelles des polysaccharides et des polyols comme le

mannitol ou le tréhalose (Frey *et al.*, 1997; Rangel-Castro *et al.*, 2002; Kalač, 2013). Dans un tel environnement, les bactéries sont en présence de différentes sources de carbone qui peuvent potentiellement moduler leur efficacité à altérer les minéraux. Des variations d'efficacité d'altération des minéraux ont ainsi été mises en évidence pour différentes bactéries, révélant que certaines sont particulièrement efficaces en présence de glucose en comparaison avec d'autres sources de carbone (*i.e.*, mannitol, tréhalose, saccharose, galactose, xylose, mannose, maltose, cellobiose, arabinose...) (Hameeda *et al.*, 2006; Reyes *et al.*, 2006; Patel *et al.*, 2008; Suleman *et al.*, 2018; Uroz *et al.*, 2009b). La source de carbone est donc un paramètre qui influence la capacité à altérer les minéraux, suggérant un possible lien avec le métabolisme bactérien.

Même si les bactéries sont capables de produire des protons et des acides, ces agents altérants peuvent avoir un impact différent sur l'altération des minéraux en fonction du pouvoir tampon de l'environnement. Notamment, un milieu présentant un fort pouvoir tampon pourrait être capable de neutraliser les protons inhibant ainsi l'effet de l'acidolyse. C'est ce que Rajawat *et al.* ont démontré pour certaines bactéries qui voyaient leur capacité de solubilisation du potassium à partir d'aluminosilicate de potassium réduite en milieu tamponné, comparé à un milieu non-tamponné (Rajawat *et al.*, 2019). En absence d'acidification, ce sont les mécanismes de complexolyse qui devraient être favorisés (Kalinowski *et al.*, 2000). Dans les sols, différentes réactions peuvent consommer des protons produits par les bactéries et ainsi tamponner leur environnement proche et la solution du sol. C'est le cas par exemple des minéraux silicatés (feldspaths, micas...) qui fixent des protons lors de leur altération. Certains minéraux peuvent donc avoir un effet tampon.

Dans les sols, les bactéries peuvent rencontrer une large variété de minéraux définis par leur cristallographie, leur taille, leur composition chimique et leur altérabilité (Dixon *et al.*, 1989; Brantley, 2008). Le type de minéral est donc susceptible d'influencer le fonctionnement et la distribution des bactéries. Si cette démonstration n'a pas été réalisée *in situ* dans le sol, le criblage de souches sur différentes formes de phosphate a révélé des variations. Il a ainsi été démontré pour des souches d'*Enterobacter*, *Pseudomonas*, *Serratia*, *Klebsiella*, *Burkholderia* ou *Aeromonas* que leur capacité à libérer le phosphore à partir de phosphate tricalcique et dicalcique était plus importante que d'autres formes de phosphate insoluble comme le phosphate de fer ou une roche phosphatée (Jha *et al.*, 2013). Une autre étude sur 10 souches bactériennes a montré une meilleure efficacité à libérer le phosphore à partir de phosphate tricalcique comparé au phosphate d'aluminium et au phosphate de fer (Fankem *et al.*, 2006). Il semblerait donc que le type de minéral influence l'efficacité des bactéries à altérer les minéraux,

bien que cela n'ait été démontré que pour des minéraux relativement altérables (*i.e.*, les phosphates).

Les bactéries hétérotrophes sont décrites pour altérer les minéraux à travers plusieurs mécanismes dont l'acidolyse (production de protons et d'acides) et la complexolyse (production de chélateurs) (Robert and Berthelin, 1986). Cependant, les déterminants génétiques impliqués dans l'altération des minéraux par les bactéries restent encore peu ou pas connus selon les taxons considérés. L'enzyme la plus décrite impliquée dans l'altération des minéraux est la glucose déshydrogénase (GDH) de la voie directe d'oxydation du glucose. Cette enzyme localisée dans le périplasma convertit le glucose en gluconate et produit un proton menant à l'acidification du milieu et l'acidolyse des minéraux (Goldstein, 1995; Illmer and Schinner, 1995; Sashidhar and Podile, 2010). A l'heure actuelle, deux types de GDH ont été décrits dans l'altération des minéraux : les GDH dépendantes du cofacteur PQQ (Gyaneshwar *et al.*, 1999; Tripura *et al.*, 2007; Intorne *et al.*, 2009; Sashidhar and Podile, 2009; Miller *et al.*, 2010; Crespo, 2011; Wang *et al.*, 2020) et une glucose/méthanol/choline (GMC) oxydoréductase dépendante du FAD ((Picard *et al.*, 2021a) ; CHAPITRE 2). Le second mécanisme le plus reporté est celui de la complexolyse des minéraux qui est liée à l'activité de chélateurs tels que les sidérophores. L'implication des sidérophores dans l'altération des minéraux a été démontrée en condition abiotique, où le sidérophore a été ajouté directement en présence d'un minéral, sans la présence de la bactérie productrice. La production et l'action des sidérophores étant difficile à mettre en évidence en condition acidifiante, la création de mutants impactés dans la production de sidérophore est nécessaire pour comprendre leur rôle dans l'altération. Des expériences sur la souche modèle *Pseudomonas aeruginosa* et ses mutants incapables de produire de la pyochéline et/ou de la pyoverdine, ont démontré que seule la pyoverdine était capable d'altérer les minéraux en condition biotique (Ferret *et al.*, 2014; Parrello *et al.*, 2016). Les travaux réalisés dans ma thèse ont révélé l'implication de malléobactine produite par la souche de *Collimonas pratensis* PMB3(1) dans l'altération des minéraux. L'implication de ce sidérophore dans l'altération a été démontrée uniquement en condition tamponnée où l'action des protons est neutralisée ((Picard *et al.*, 2021b) ; CHAPITRE 3).

D'après nos connaissances, aucune étude n'a analysé l'influence du type de minéral (*i.e.*, facteurs intrinsèques) et des paramètres environnementaux (*i.e.*, facteurs extrinsèques) sur les mécanismes moléculaires développés par les bactéries pour altérer les minéraux. Nous avons considéré dans ce chapitre que le pouvoir tampon du milieu et la source de carbone disponible étaient des facteurs extrinsèques importants pouvant potentiellement influencer les mécanismes

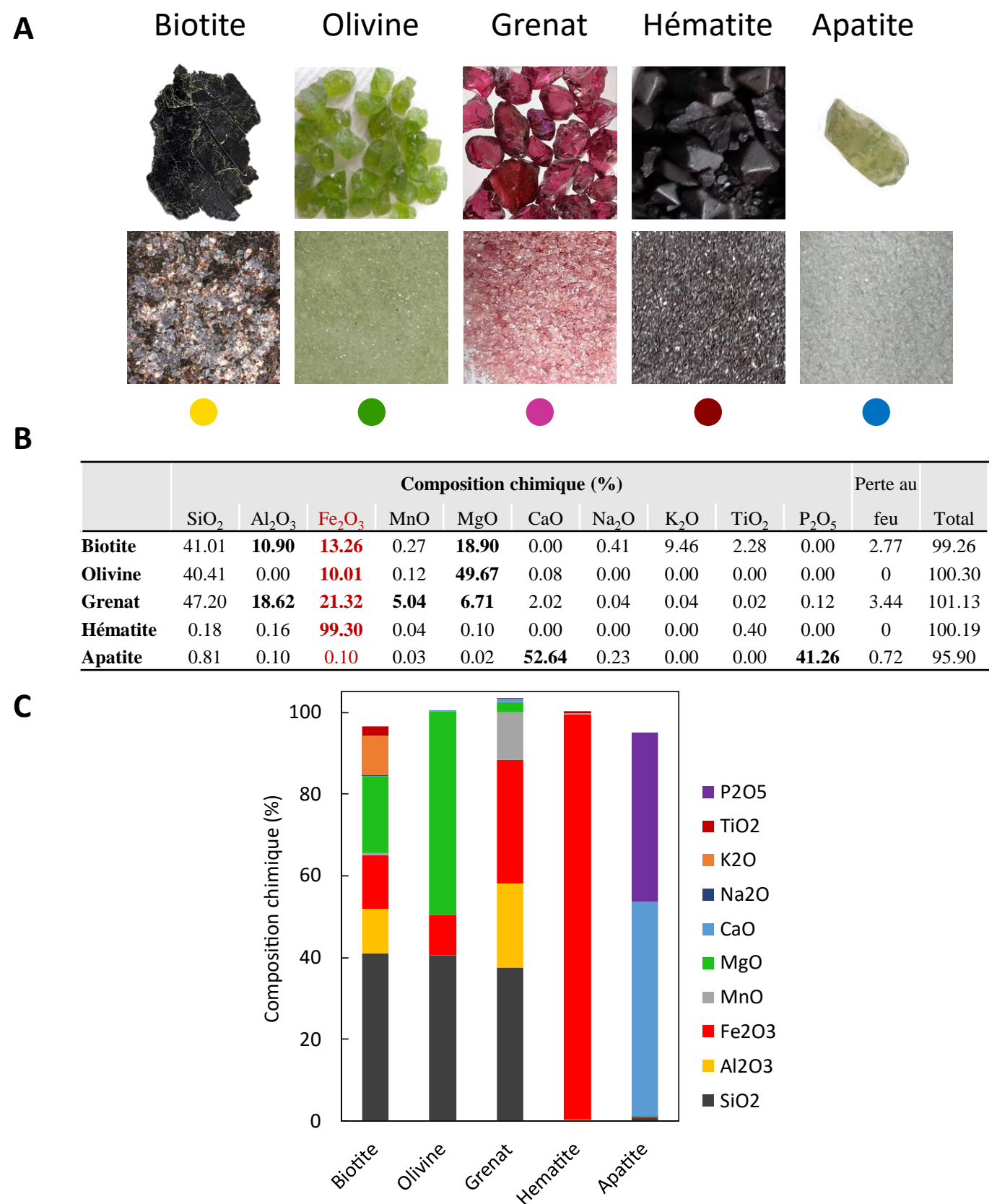


Figure 4.1 : Propriétés des minéraux, aspect et composition chimique

Le panel **A** illustre les différents minéraux utilisés dans cette étude. Le panel **B** indique la composition chimique des minéraux. Les données en gras représentent les principaux éléments chimiques présents dans la composition de chaque minéraux, ce sont ceux utilisés pour mesurer la dissolution des minéraux. Le silicium a été retiré de l'étude car les tubes en verre relarguent une partie de leur silicium lors des expérimentations. Le potassium n'a pas été étudié car présent dans les milieux de cultures utilisés tout comme le magnésium dans le milieu AB. Les valeurs en rouges représentent la quantité de fer de chaque minéraux, c'est l'élément chimique commun pour tous les minéraux sauf l'apatite. Le panel **C** est une représentation en barres du tableau en panel **B**.

moléculaires de l'altération des minéraux par les bactéries. Dans ce contexte, le but de cette étude a été de déterminer l'effet (i) de la source de carbone disponible, (ii) du pouvoir tampon du milieu et (iii) du type de minéral, sur l'efficacité et les mécanismes impliqués dans l'altération des minéraux par les bactéries. Pour répondre à cette question, la souche modèle *Collimonas pratensis* PMB3(1) a été sélectionnée pour sa forte efficacité à altérer les minéraux comparée à d'autres souche altérantes (Uroz *et al.*, 2009b). D'un point de vue moléculaire, cette souche altère les minéraux par acidolyse en présence de glucose *via* une GMC oxydoréductase (Picard *et al.*, 2021a). Elle est également capable de produire de la malléobactine, un sidérophore impliqué dans l'altération de l'hématite par complexolyse (Picard *et al.*, 2021b). En utilisant des approches de mutagenèse couplées avec des tests biotiques et abiotiques d'altération *in vitro*, nous avons été capables de déterminer dans cette étude l'efficacité de la souche modèle PMB3(1) et l'implication de la GMC et de la malléobactine dans l'altération de cinq minéraux différents (*i.e.*, biotite, olivine, grenat, hématite, apatite), en présence de deux sources de carbones (*i.e.*, glucose ou mannitol) et deux milieux possédant des pouvoirs tampons différents (*i.e.*, BHm et AB).

3. Matériels et méthodes

3.1. Matériel minéral

Cinq minéraux différents : apatite, biotite, olivine, hématite et grenat ont été sélectionnés pour leur abondance dans les sols et leur propriétés physico-chimiques contrastées (INTRODUCTION §2.1.1). Leur composition chimique a été déterminée par spectrométrie à plasma à couplage inductif (ICP-AES) après une fusion alcaline avec du LiBO₂ et une dissolution au HNO₃ (Figure 4.1B). Les cristaux les plus purs pour chaque minéral ont été broyés et tamisés pour obtenir des fractions homogènes en taille comprise entre 200 et 500 µm. Les particules fines ont été ôtées par ultra-sons.

3.2. Matériel biologique

La souche modèle *Collimonas pratensis* PMB3(1) provient de la mycorrhizosphère du chêne associé au champignon ectomycorhizien *Scleroderma citrinum* (CHAPITRE 1 §2.1). Trois mutants de la souche PMB3(1) ont été analysés dans cette étude (Tableau 4.1). Le mutant 25(10F) a été obtenu par mutagenèse aléatoire (insertion du plasposon Tn5-OT182) et est muté au niveau du gène *gdhC* (Picard *et al.*, 2021a). Ce gène code pour la sous-unité cytochrome

Tableau 4.1 : Description des souches bactériennes utilisées dans cette étude

Strains	Characteristics	References
<i>Collimonas pratensis</i> PMB3(1)	Wild type strain	Uroz <i>et al.</i> , 2007
25(10F)	Tet ^R , PMB3(1)(gdhC::pOT182) disruptant ; wild type strain with OT182 plasposon insertion into <i>gdhC</i> gene	Picard <i>et al.</i> , 2021a
ΔNRPS	PMB3(1)(NRPS::Gm) ; wild type strain with Gm ^R cassette inserted in double crossing over into <i>mbaA</i> gene	Picard <i>et al.</i> , 2021b
25(10F)ΔNRPS	Tet ^R , Gm ^R , 25(10F)(NRPS::Gm) ; 25(10F) mutant with Gm ^R cassette inserted in double crossing over into <i>mbaA</i> gene	This study

d'une GMC oxydoréductase dont l'implication dans l'altération de la biotite a été démontrée (Picard *et al.*, 2021a). Le second mutant utilisé dans cette étude est le mutant Δ NRPS construit par mutagenèse ciblée sur le gène *mbaA* (Picard *et al.*, 2021b). Ce gène code pour une peptide synthétase non-ribosomale (NRPS) responsable de la synthèse de malléobactine. L'implication de ce sidérophore dans l'altération de l'hématite a été démontrée (Picard *et al.*, 2021b). Enfin, dans le cadre de cette étude, un double mutant 25(10F) Δ NRPS a été construit. Il a été produit par l'insertion d'une cassette de résistance à la gentamycine au niveau du site de restriction *SmaI* du gène *mbaA* du mutant 25(10F) (selon la même procédure détaillée dans le CHAPITRE 3). Toutes les souches bactériennes ont été cultivées à 25 °C. Lorsque cela était nécessaire et seulement pour les précultures des mutants, des antibiotiques ont été ajoutés dans le milieu de culture aux concentrations suivantes : tétracycline 10 μ g/ml et gentamycine 20 μ g/ml.

3.3. Préparation de l'inoculum bactérien

Les tests biotiques ont été réalisés avec des suspensions bactériennes calibrées (inoculum). Cet inoculum a été préparé de la manière suivante. A partir du stock de glycérol à -80 °C, une préculture des souches bactériennes en milieu solide AB mannitol (2 g/l) a été réalisée (Chilton *et al.*, 1974) (Annexe2). Après 2 jours de culture à 25 °C, une colonie bactérienne a été prélevée afin d'inoculer 50 ml de milieu AB mannitol liquide. La culture a été incubée à 25 °C sous agitation (150 rpm) pendant 2 jours. La culture a été ensuite centrifugée à 8000 g, 15 min, 10 °C. Le culot bactérien a été lavé 3 fois dans 10 ml d'eau mQ stérile et a été resuspendu dans de l'eau mQ stérile. Pour contrôler la quantité de cellules inoculée, la $DO_{(595\text{ nm})}$ a ensuite été ajusté à 0.90 ± 0.03 .

3.4. Biotests

Pour évaluer l'impact des mutations sur les mutants, trois biotests ont été réalisés.

3.4.1. Solubilisation du phosphate

Des gouttes de 5 μ l de chaque suspension calibrée (WT ou mutants) ont été inoculées en triplicats sur la surface du milieu solide TCP supplémenté avec 10 g/l de glucose. La solubilisation du phosphate a été évaluée par la mesure du diamètre du halo autour de la colonie après 7 jours d'incubation.

3.4.2. Acidification du milieu

Dix microlitres de suspension calibrée ont été inoculés dans 190 µl de milieu TCP liquide (sans tricalcium phosphate ; Annexe 2). Après une incubation de 3 jours, la microplaque a été centrifugée à 5000 g, 15 min, 4 °C et 180 µl de surnageant ont été prélevés et ajoutés à 20 µl de vert de bromocrésol (1 g/l ; indicateur coloré). L'absorbance à 595 nm a été mesurée permettant d'évaluer le pH de la solution (Uroz *et al.*, 2007).

3.4.3. La production de sidérophore

Le milieu Chrome Azurol S (CAS) a été réalisé selon (Schwyn and Neilands, 1987) (Annexe 2). Des gouttes de 5 µl de suspension bactérienne ont été inoculées en triplicats sur la surface du milieu CAS solide. Après une incubation à 25 °C pendant 7 jours, la présence d'un halo jaune/orangé indique la présence de chélateurs de fer tels que les sidérophores. Le diamètre du halo a été mesuré ainsi que celui de la colonie.

3.5. Altération abiotique des minéraux

3.5.1. Préparation des solutions

Pour déterminer l'altérabilité des minéraux sélectionnés, une solution de HCl et citrate à 10 mM a été utilisée permettant de mimer une acido-complexolyse. La quantité d'acide chlorhydrique a été ajustée pour obtenir les pH suivants : 3.15, 4.15, 5.01 et 5.22. Ces solutions ont été utilisées pour solubiliser le citrate à une concentration finale de 10 mM chacune. Le pH des solutions de citrate a ensuite été réajusté à 3.08, 4.19, 4.99, 6.02 avec du NaOH (2N). Toutes les solutions ont été stérilisées par autoclavage à 121 °C (le pH des solutions a à nouveau été mesuré après autoclavage).

3.5.2. Mesure de l'altérabilité des minéraux testés

Avant l'ajout des minéraux, les tubes en verre ont été lavés à l'acide chlorhydrique (HCl, 3.6 %) et rincés trois fois à l'eau mQ. Cent milligrammes de minéraux ont été introduits dans chaque tube. Les tubes lavés et contenant les minéraux ont été autoclavés à 121 °C. Cinq millilitres de solution de citrate stérile ont été ajoutés dans chaque tube de façon stérile. Les tubes ont ensuite été incubés sous agitation à 25 °C, 150 rpm. Après 7 jours d'incubation, les

solutions ont été filtrées à 0.22 µm et stockées à -20 °C pour les analyses chimiques. La concentration en mg/l des éléments chimiques issus de l'altération des minéraux (*i.e.*, Fe, Mg, Al, Mn, Ca, P) pour chaque échantillon a été mesurée par spectrométrie à plasma à couplage inductif (700 Series ICP-OES, Agilent Technologies).

3.6. Altération biotique des minéraux

3.6.1. Les milieux de culture utilisés

Pour cette étude, deux milieux de culture ont été choisis (*i.e.*, AB et BHm) (Annexe 2). Ces deux milieux de culture bien que leur composition chimique ne soit pas identique sont tous deux considérés comme des milieux pauvres. Ils ont tous deux été carencés en fer. Le milieu AB a été choisi pour son fort pouvoir tampon permettant de neutraliser les phénomènes d'acidolyse et de privilégier la complexolyse. A l'inverse, le milieu BHm modifié (Uroz *et al.*, 2007) présente une faible capacité tampon permettant les processus d'acidolyse. Ces deux milieux de cultures ont été supplémentés avec soit du glucose soit du mannitol à une concentration finale de 2 g/l. Le glucose a été choisi pour son implication dans la voie d'oxydation directe et menant ainsi à la production de protons. De plus, il représente la source de carbone dominante dans les sols forestiers et les exsudats racinaires. Il est également le constituant de plusieurs polysaccharides comme le saccharose, le tréhalose ou l'amidon (Derrien *et al.*, 2004). Au contraire, le mannitol est un polyol d'origine fongique retrouvé au niveau de la mycorrhizosphère. Son métabolisme par la souche modèle PMB3(1) implique des voies peu acidifiantes.

3.6.2. Test d'altération biotique

Les minéraux utilisés pour cette expérience sont la biotite, l'olivine, le grenat et l'hématite. Les tests d'altération sur l'apatite n'ont pas encore été réalisés en condition biotique.

Avant introduction des minéraux, les tubes en verre ont été lavés à l'acide chlorhydrique (HCl, 3.6 %) et rincés trois fois à l'eau mQ. Les tubes contenant 100 mg de minéraux ont ensuite été stérilisés par autoclavage à 121 °C. Pour le test d'altération, 4.5 ml de milieu (AB ou BHm avec glucose ou mannitol) ont été distribués dans chaque tube puis 500 µl de suspension bactérienne ont été inoculés (WT, 25(10F), ΔNRPS ou 25(10F)ΔNRPS). Des milieux non-inoculés avec ou sans minéraux ont été utilisés comme contrôles. Après 7 jours d'incubation à 25 °C sous agitation à 150 rpm, 200 µl de chaque culture ont été échantillonnés et distribués dans une

microplaque de 96 puits. L'absorbance à 595 nm a été mesurée afin d'évaluer la croissance bactérienne. La microplaque a ensuite été centrifugée à 5000 g 15 min 10 °C. Les surnageants ont été utilisés pour mesurer le pH en ajoutant 20 µl de vert de bromocrésol aux 180 µl de surnageant. L'absorbance a ensuite été mesurée à 595 nm. Le restant de culture (environ 3 ml) a été transvasé dans des tubes falcon de 15 ml pour être centrifugé à 7000 g pendant 15 min. Le surnageant a ensuite été filtré à 0.22 µm et congelé à -20 °C pour une analyse ICP-OES (décrit ci-dessus). Les valeurs moyennes des trois réplicats indépendants pour la densité bactérienne, le pH et la quantité d'éléments dissous ont été utilisés pour évaluer l'altération des minéraux dans chaque condition.

3.7. Mesure de l'altération des minéraux et calcul du taux de dissolution

La dissolution a été évaluée pour chaque minéral par la libération des éléments en solution. Seuls les éléments non présents dans le milieu de culture ou dans les contenants (les tubes en borosilicate contiennent du silicium) ont été sélectionnés comme traceurs de l'altération. Concrètement ce sont : pour la biotite : Fe, Mg, Al ; pour l'olivine : Fe, Mg ; pour le grenat : Fe, Mg, Al, Mn ; pour l'hématite : Fe, pour l'apatite : P, Ca (Figure 4.1B).

Pour pouvoir comparer l'altérabilité de chacun des minéraux entre eux, il a été nécessaire de calculer le taux de dissolution (%) correspondant à la quantité d'élément chimique libéré rapporté à la quantité d'élément chimique contenu dans la structure cristalline du minéral.

$$K (\%) = \frac{Qté\ élément\ libéré}{Qté\ élément\ dans\ le\ minéral}$$

K : taux de dissolution* du minéral (pour un élément chimique donné) exprimé en %.

Qté élément libéré : quantité d'élément chimique libéré par le minéral lors de son altération (mg).

Qté élément dans le minéral : quantité d'élément chimique présent dans la structure cristalline du minéral (mg) à raison de 100 mg de minéral dans 5 ml de solution.

*Si il n'y a pas eu de reprécipitation

3.8. Analyses statistiques

Les analyses statistiques ont été réalisées sur le logiciel R. Les données présentées dans cette étude sont des moyennes de trois réplicats indépendants. Les différences des moyennes des

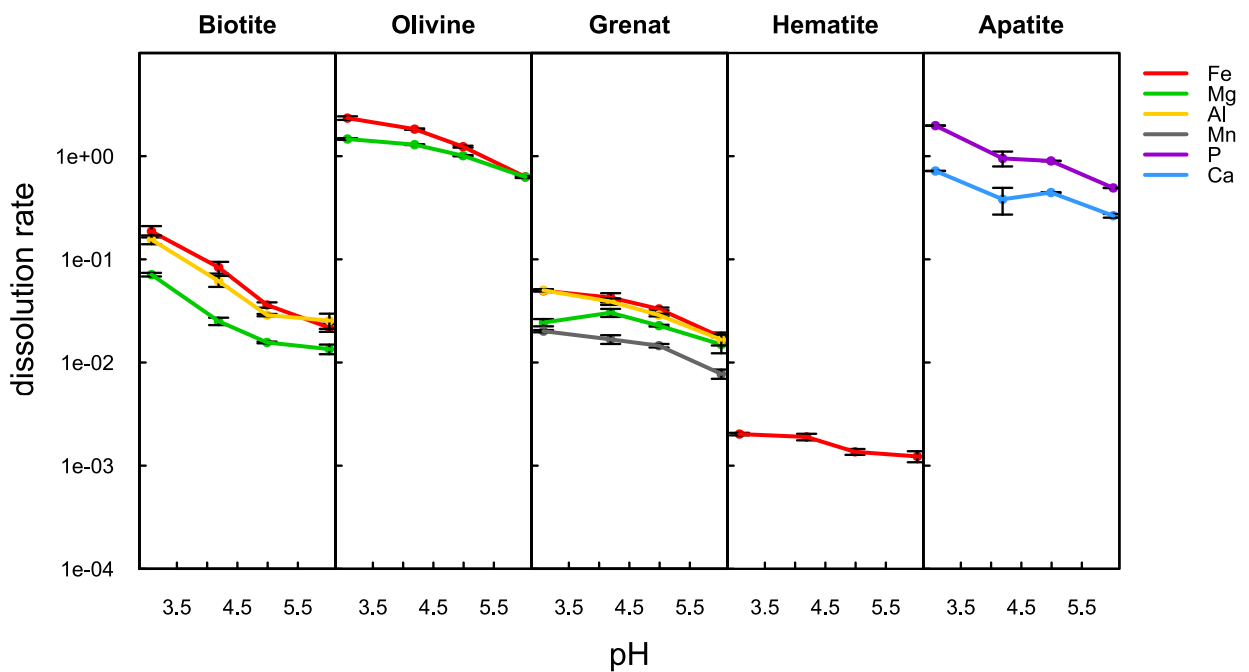


Figure 4.2 : Différentes altérabilité des minéraux

La dissolution des minéraux sélectionnée a été évaluée dans une condition mimant l'acido-complexolyse (HCl et citrate 10 mM à pH 3.08, 4.19, 4.99 et 6.02). Les différents graphiques représentent le logarithme du taux de dissolution en fonction du pH des différentes solutions testées. L'apatite et l'olivine présentent des taux de dissolution similaires et sont les deux minéraux les plus altérables. Les taux de dissolution du grenat et de la biotite sont du même ordre de grandeur. Enfin, l'hématite est le minéral le moins altérable.

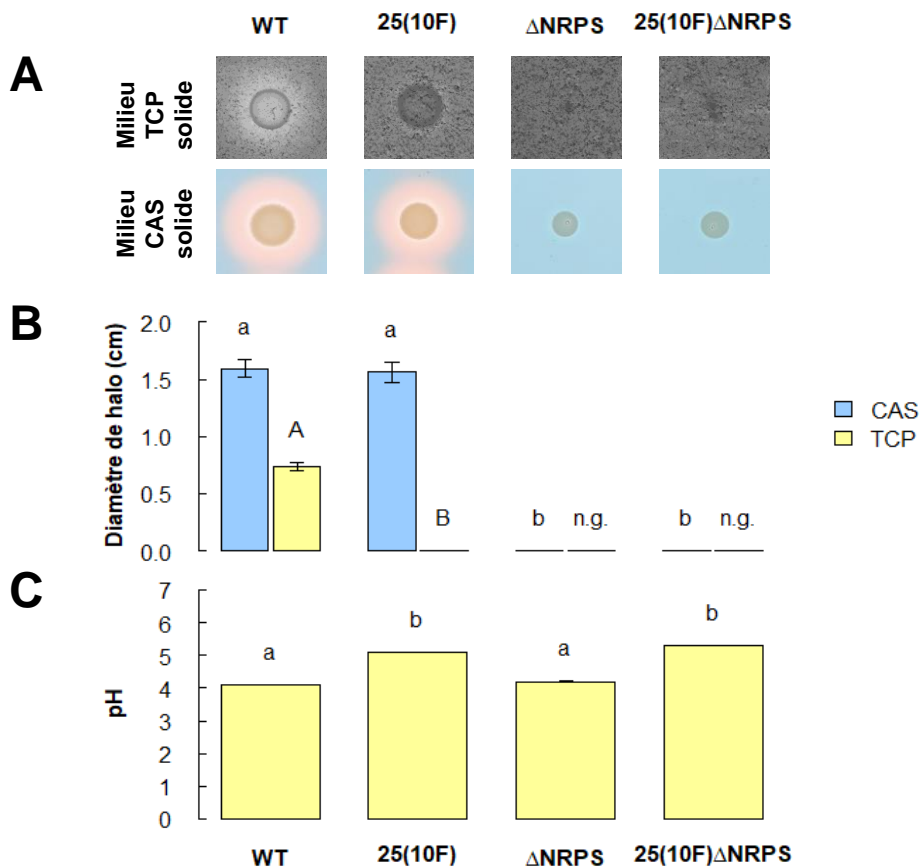


Figure 4.3 : Caractérisation du potentiel d'altération des mutants

La capacité des mutants (*i.e.* 25(10F), Δ NRPS, 25(10F) Δ NRPS) à solubiliser le phosphate, acidifier le milieu TCP et mobiliser le fer sont représentées sur cette figure. (A) Photographies des colonies bactériennes développées au bout de 7 jours de culture sur milieu TCP ou CAS solide. (B) Diamètre de halo mesurés après 7 jours de culture sur milieu TCP ou CAS solide. Les lettres minuscules et majuscules indiquent les différences significatives de diamètre de halo sur milieu CAS et TCP respectivement ($P < 0.05$). Les mutants Δ NRPS et 25(10F) Δ NRPS n'ont pas été capable de croître sur le milieu TCP, indiqué par les lettres n.g.. (C) Le pH du milieu TCP après 3 jours de culture est représenté. Les différences significatives sont indiquées par les lettres minuscules ($P < 0.05$).

* Une partie des données présentées ci-dessus a déjà été publiée (Picard *et al.*, 2021a ; Picard *et al.*, 2021b)

échantillons ont été analysées par une ANOVA à un facteur suivi d'un test TukeyHSD avec une P-value < 0.05.

4. Résultats

4.1. Evaluation de l'altérabilité des minéraux

Pour déterminer l'altérabilité des minéraux sélectionnés (*i.e.*, biotite, olivine, grenat, hématite et apatite), des tests d'altération abiotiques mimant une acido-complexolyse ont été réalisés à différents pH (3, 4, 5, 6). Pour pouvoir comparer la dissolution des minéraux, les calculs de taux de dissolution ont été réalisés. Cette première expérience a permis de mettre en évidence que les minéraux possédaient différentes altérabilités. Notamment, l'olivine et l'apatite ont des taux de dissolution similaires et sont les minéraux les plus altérables avec un taux de dissolution de 2.34 et 1.98 % pour le fer de l'olivine et le phosphate de l'apatite respectivement à pH 3. La dissolution de la biotite et du grenat présente le même ordre de grandeur (surtout à pH neutre), entre 0.19 et 0.05 % de fer dissout à pH 3 respectivement et 0.02 % à pH 6 pour les deux minéraux. Enfin, l'hématite est le minéral le moins altérable dans nos conditions expérimentales avec un taux de dissolution maximum de 0.002 % (Figure 4.2).

4.2. Caractérisation phénotypique des mutants

A travers différents biotests, la souche modèle *Collimonas pratensis* PMB3(1) et ses différents mutants ont été évalués pour leur potentiel d'altération des minéraux (*i.e.*, solubilisation du phosphate, acidification, et production de sidérophore) (Figure 4.3). Une partie des résultats présentés ci-dessous a déjà été publiée mais il est tout de même nécessaire de rappeler le phénotype des souches testées et surtout de pouvoir les comparer.

L'analyse des biotests a permis de démontrer que le mutant 25(10F) n'était pas impacté dans la production de sidérophore comparé à la souche WT (halo de 1.56 ± 0.03 cm ; $P > 0.05$) mais restait significativement altéré dans sa capacité à solubiliser le phosphate et acidifier le milieu comme démontré par (Picard *et al.*, 2021a) ($P < 0.05$). A l'inverse, le mutant Δ NRPS n'était plus capable de mobiliser le fer sur le milieu CAS confirmant le résultat annoncé par (Picard *et al.*, 2021b). Dans cette nouvelle étude, nous avons mis en évidence que ce mutant Δ NRPS n'était pas capable de croître sur le milieu TCP solide alors qu'il l'est dans le milieu TCP liquide (biomasse faible). Ces tests ont montré que le mutant Δ NRPS ne présentait pas de différences significatives dans sa capacité à acidifier le milieu TCP comparativement à la souche WT (pH

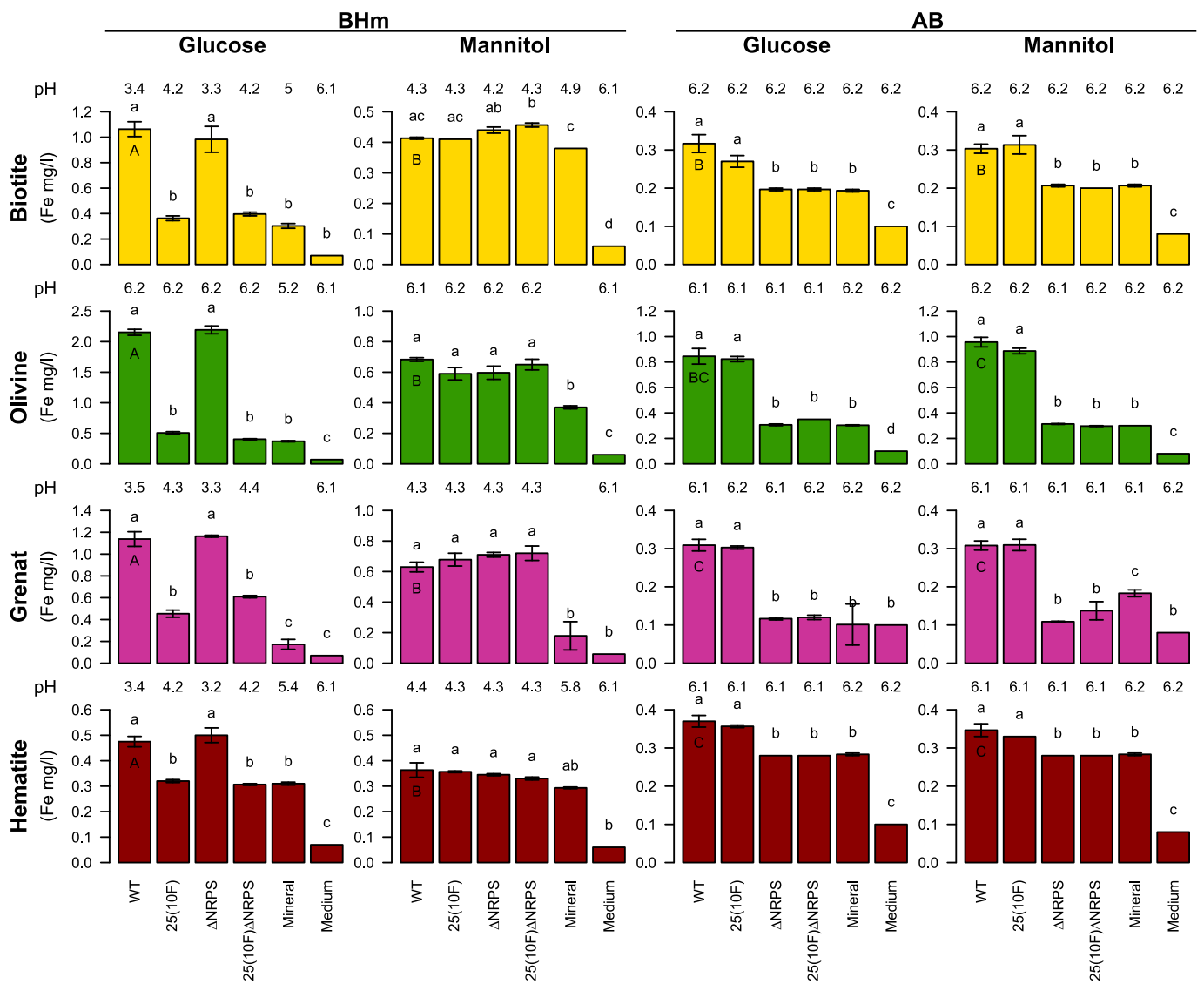


Figure 4.4 : Altération des minéraux par la souche PMB3(1) et ses mutants

L'altération des minéraux a été évaluée par la libération de fer à partir des minéraux après 7 jours de culture dans un milieu à faible ou fort pouvoir tampon (respectivement, milieu BHm ou AB) supplémenté avec du glucose ou du mannitol (2 g/l). Les contrôles non-inoculés avec ou sans minéraux permettent d'évaluer la dissolution passive du minéral ou la carence en fer dans le milieu respectivement. Le pH du milieu est indiqué au-dessus de chaque barre. Les lettres minuscules indiquent les différences significatives entre la souche sauvage, les mutants et les contrôles non-inoculés. Les lettres majuscules indiquent les différences significatives pour la souche sauvage en fonction des différentes conditions testées ($P < 0.05$).

de 4.2 ± 0.01) ($P < 0.05$). Enfin, le double mutant 25(10F) Δ NRPS était significativement impacté dans sa capacité à mobiliser le fer sur le milieu CAS (pas de halo formé) comparativement à la souche sauvage. Ce mutant a paru lui aussi incapable de croître sur le milieu TCP solide mais le test en liquide a permis de démontrer qu'il y avait une faible croissance du mutant. Dans ce biotest TCP liquide, le double mutant était significativement différent de la souche sauvage dans sa capacité à acidifier le milieu ($\text{pH}_{25(10F)\Delta\text{NRPS}} = 5.3 \pm 0.01$ vs $\text{pH}_{\text{WT}} = 4.2 \pm 0.01$; $P < 0.05$).

4.3. Altération des minéraux par la souche PMB3(1) et ses mutants

Les tests d'altération biotique avec l'apatite n'ont pas encore été réalisés. Le reste de ce chapitre ne traitera donc que des quatre minéraux suivants : biotite, olivine, grenat et hématite.

Pour évaluer l'efficacité de la souche WT et de ses mutants dans l'altération des minéraux en fonction des facteurs extrinsèques et intrinsèques, les éléments chimiques libérés par les minéraux ont été mesurés. Sachant que tous les éléments chimiques libérés par les minéraux suivent le même schéma, pour des raisons de clarté, nous avons choisi de présenter le fer qui est l'élément chimique présent dans la composition des quatre minéraux testés (*i.e.*, biotite, olivine, grenat et hématite) et qui est absent des deux milieux de culture.

4.3.1. Effet des facteurs extrinsèques

Pour répondre à la problématique de ce chapitre, cette section traitera dans un premier temps l'effet des facteurs extrinsèques sur l'efficacité de la souche WT à altérer les minéraux et dans un second temps, l'effet de ces facteurs sur les mécanismes moléculaires de l'altération (différences entre WT et mutants).

4.3.1.1. Effet du milieu de culture sur l'efficacité d'altération par la souche sauvage PMB3(1)

La comparaison de l'altération passive des minéraux (contrôle avec minéral non-inoculé) et de l'altération des minéraux en présence de la souche modèle indique qu'il y a bien une altération active biotique des minéraux dans toutes les conditions (Figure 4.4).

L'effet du milieu sur l'efficacité d'altération des minéraux a été évalué en comparant les milieux BHm et AB en présence de **glucose**. La souche PMB3(1) libère 1.10 mg/l de fer à partir de la

biotite dans le milieu faiblement tamponné (BHm) ce qui est significativement plus important comparé au milieu AB (0.32 mg/l de fer libéré par la biotite ; $P < 0.05$). Cette différence significative est observée pour les autres minéraux où 2.15, 1.14 et 0.48 mg/l de fer sont libérés en BHm glucose contre 0.69, 0.31 et 0.37 mg/l en AB glucose pour respectivement l'olivine, le grenat et l'hématite. De façon intéressante, en présence d'un tampon faible, tel que dans le milieu (BHm) et de glucose, la souche bactérienne PMB3(1) acidifie le milieu de culture à un pH d'environ 3.4 pour la biotite, le grenat et l'hématite. Dans ces conditions, pour l'olivine le pH est de 6.2. Tandis qu'en présence d'un milieu avec un tampon fort (AB) le pH reste stable à 6.2 pour tous les minéraux.

En considérant l'effet du milieu de culture en présence de **mannitol**, la souche sauvage altère plus efficacement la biotite, le grenat et l'hématite dans le milieu BHm que dans le milieu AB avec 0.41, 0.63 et 0.36 mg/l de fer dans le milieu BHm mannitol contre 0.30, 0.31 et 0.35 mg/l de fer dans le milieu AB mannitol pour respectivement la biotite, le grenat et l'hématite. Cela reste une tendance et les différences ne sont significatives que pour le grenat. Pour l'olivine, c'est en milieu AB mannitol que la plus forte altération a été mesurée (BHm mannitol : 0.68 mg/l ; AB mannitol : 0.96 mg/l de fer ; $P < 0.05$).

Quel que soit le minéral testé (à l'exception de l'olivine), la souche WT acidifie le milieu BHm mannitol à environ 4.3 tandis que le pH du milieu AB reste stable à pH 6.2. Pour l'olivine, le pH mesuré est de 6.2 en milieu AB et en milieu BHm.

4.3.1.2. Effet de la source de carbone sur l'efficacité à altérer les minéraux par la souche sauvage

Dans le milieu à **faible pouvoir tampon** (BHm), la souche sauvage a altéré plus efficacement et significativement les minéraux en présence de glucose comparé au mannitol avec une libération de fer de 1.10, 2.20, 1.10 et 0.47 mg/l avec le glucose contre 0.41, 0.68, 0.63 et 0.36 mg/l avec le mannitol ($P < 0.05$), confirmant les résultats antérieurs (Uroz *et al.*, 2009b). De manière intéressante, la souche WT acidifie plus efficacement le milieu BHm en présence de glucose (pH = 3.4) par rapport au mannitol (pH = 4.3).

En considérant le milieu **fortement tamponné** (AB), aucune différence d'efficacité n'a été observée entre les deux sources de carbone utilisées.

4.3.1.3. Effet du milieu de culture et de la source de carbone sur les mécanismes moléculaires de l'altération

Dans le milieu **faiblement tamponné** (BHm) supplémenté avec du **glucose**, les mutants 25(10F) et 25(10F) Δ NRPS altèrent les minéraux significativement moins que la souche sauvage WT (0.36, 0.51, 0.45 et 0.32 mg/l de fer pour la souche 25(10F) contre 1.10, 2.20, 1.10 et 0.47 mg/l pour la souche WT pour la biotite, l'olivine, le grenat et l'hématite respectivement ; $P < 0.05$). Ces deux mutants 25(10F) et 25(10F) Δ NRPS acidifient également moins le milieu de culture comparé à la souche sauvage (pH de 4.2 et 3.4 pour les mutants et le WT respectivement). Le mutant Δ NRPS n'est pas significativement différent de la souche WT dans sa capacité à altérer les minéraux et à acidifier le milieu ($P < 0.05$).

Dans le milieu **faiblement tamponné** (BHm) en présence de **mannitol**, aucune différence significative n'a été observée entre les mutants et la souche sauvage, le pH étant d'environ 4.3 pour toutes les souches (à l'exception du cas de l'olivine explication (§5.2.1)).

En ce qui concerne le **milieu tamponné AB** supplémenté avec du **glucose**, les deux mutants Δ NRPS et 25(10F) Δ NRPS altèrent les minéraux significativement moins que la souche WT en libérant 0.20, 0.31, 0.12 et 0.28 mg/l de fer pour le mutant Δ NRPS contre 0.32, 0.69, 0.31, 0.37 mg/l de fer pour la souche WT pour la biotite, l'olivine, le grenat et l'hématite respectivement ($P < 0.05$). Lorsque le **milieu tamponné AB** est supplémenté avec du **mannitol**, la quantité de fer libéré par toutes les souches suivent la même tendance que dans le milieu AB glucose.

4.3.2. Effet des propriétés du minéral (facteurs intrinsèques)

Pour pouvoir comparer la dissolution de différents types de minéraux considérés dans cette étude, il est nécessaire de calculer le taux de dissolution (K) qui est la quantité d'un élément chimique libéré rapportée à la quantité de cet élément dans la structure du minéral. Ce taux est exprimé en % (voir matériels et méthodes §3.7). Ce calcul permet de faire abstraction des différences de composition chimique existant entre les minéraux.

L'efficacité à altérer les minéraux de la souche sauvage en fonction du type de minéral sera traitée pour la souche sauvage dans la première section. La deuxième section traitera ensuite des mécanismes moléculaires de l'altération en fonction du type de minéral, en se basant sur une comparaison des taux de dissolution obtenus pour les mutants *vs* la souche WT.

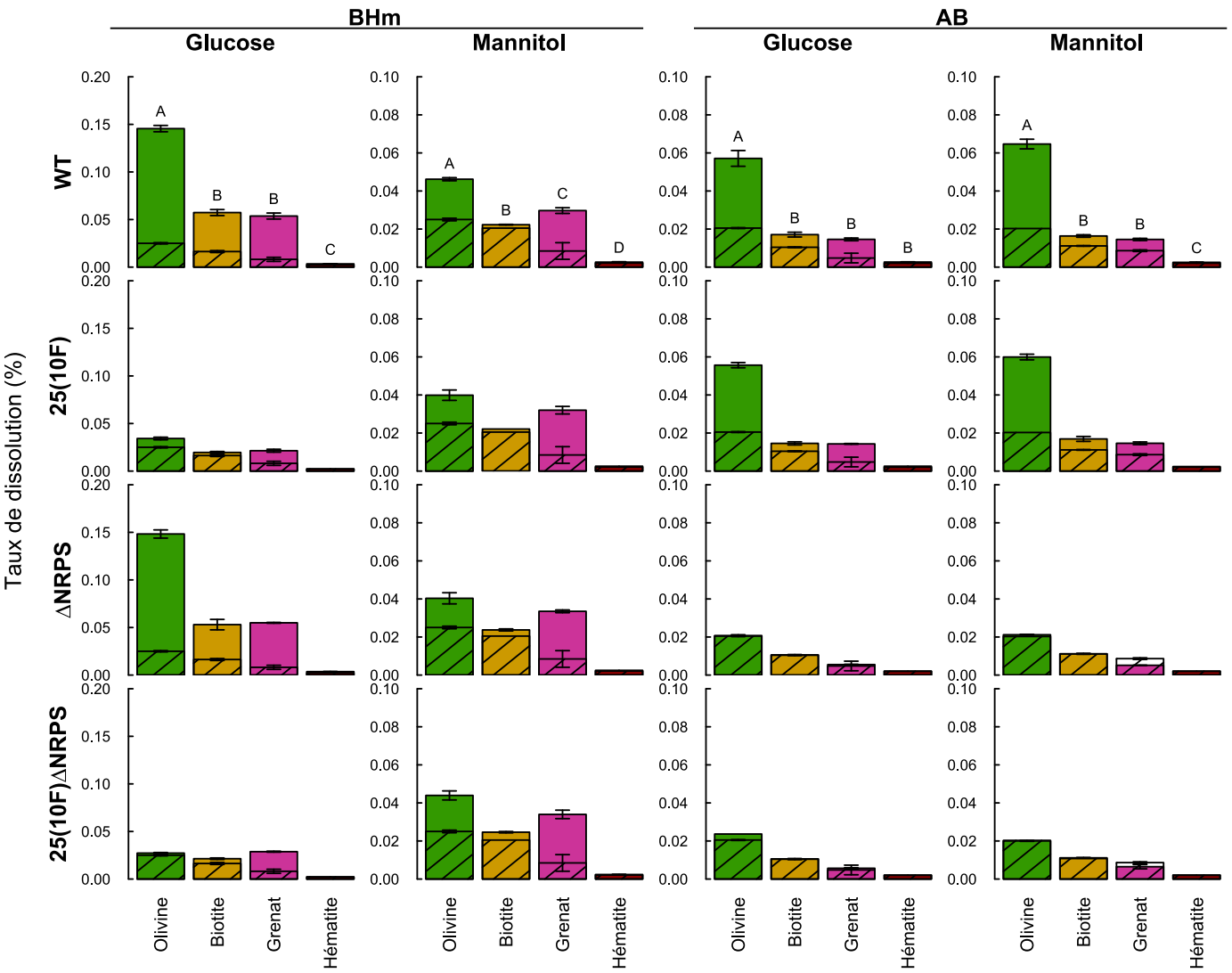


Figure 4.5 : Taux de dissolution des minéraux par la souche PMB3(1) et ses mutants

Taux de dissolution du fer libéré à partir des minéraux par les différentes souches bactériennes (WT, 25(10F), Δ NRPS et 25(10F) Δ NRPS) dans les 4 conditions de cultures testées (BHM ou AB avec glucose ou mannitol). Les barres colorées représentent le taux de dissolution du fer de la souche considérée, la partie hachurée indique le taux de dissolution du fer par le contrôle non-inoculé (dissolution passive du minéral). Les lettres majuscules indiquent les différences significatives entre les taux de dissolution des minéraux dans un milieu donné par la souche sauvage ($P < 0.05$).

4.3.2.1. Effet du type de minéral sur l'efficacité d'altération

Dans toutes les conditions testées (milieu et source de carbone) la même tendance générale a été observée : (i) l'olivine s'est altérée de façon plus importante comparée aux autres minéraux, (ii) le grenat et la biotite ont présenté des taux de dissolution similaires et (iii) l'hématite reste le minéral le moins altéré. Par exemple, dans le milieu BHm glucose, le taux de dissolution (K) calculé pour la souche WT avec l'olivine est de 0.150 % (Figure 4.5). Ce taux de dissolution est significativement plus élevé que celui obtenu pour la biotite (K = 0.057 %), le grenat (K = 0.054 %) et l'hématite (K = 0.003 %) ($P < 0.05$). La souche WT altère la biotite et le grenat de manière significativement similaire ($P > 0.05$).

4.3.2.2. Effet du type de minéral sur les mécanismes moléculaires de l'altération

Pour déterminer si les mécanismes moléculaires impliqués dans la dissolution des minéraux diffèrent en fonction du type de minéral, une comparaison entre mutants et souche WT a été réalisée. Pour ce faire, le taux d'altération du fer libéré par un mutant (K(mutant)) a été rapporté au taux de dissolution du fer libéré par la souche sauvage (K(WT)) : $R = K(\text{mutant}) / K(\text{WT})$ (Figure 4.6). Si le rapport R se rapproche de 1 (*i.e.*, $R = 1$), alors le mutant considéré présente un taux d'altération proche de la souche sauvage. Si R est inférieur à 1 (*i.e.*, $R < 1$), le mutant considéré est impacté dans sa capacité à altérer les minéraux, comparé à la souche sauvage. Ce calcul permet de faire abstraction des différences d'altérabilité existant entre les minéraux.

En **BHm glucose**, les rapports R des mutants 25(10F) et 25(10F) Δ NRPS sont de : 0.34 et 0.37 pour la biotite ; 0.24 et 0.19 pour l'olivine ; 0.40 et 0.54 pour le grenat ; 0.68 et 0.64 pour l'hématite. D'après la comparaison des taux de dissolution des mutants 25(10F) et 25(10F) Δ NRPS avec ceux de la souche sauvage, les mutants sont significativement différents de la souche sauvage en ce qui concerne les tests avec biotite, olivine et grenat ($P < 0.05$). En revanche, le mutant Δ NRPS présente des rapports R proches de 1 pour tous les minéraux testés ($R = 0.92, 1.0, 1.0$ et 1.1 pour la biotite, l'olivine, le grenat et l'hématite respectivement).

Dans le milieu **BHm mannitol**, les rapports R des mutants 25(10F), Δ NRPS et 25(10F) Δ NRPS sont tous proches de 1 pour la biotite, l'olivine, le grenat et l'hématite. Démontrant que le taux de dissolution des minéraux est similaire pour les mutants et la souche WT. Ce résultat a été

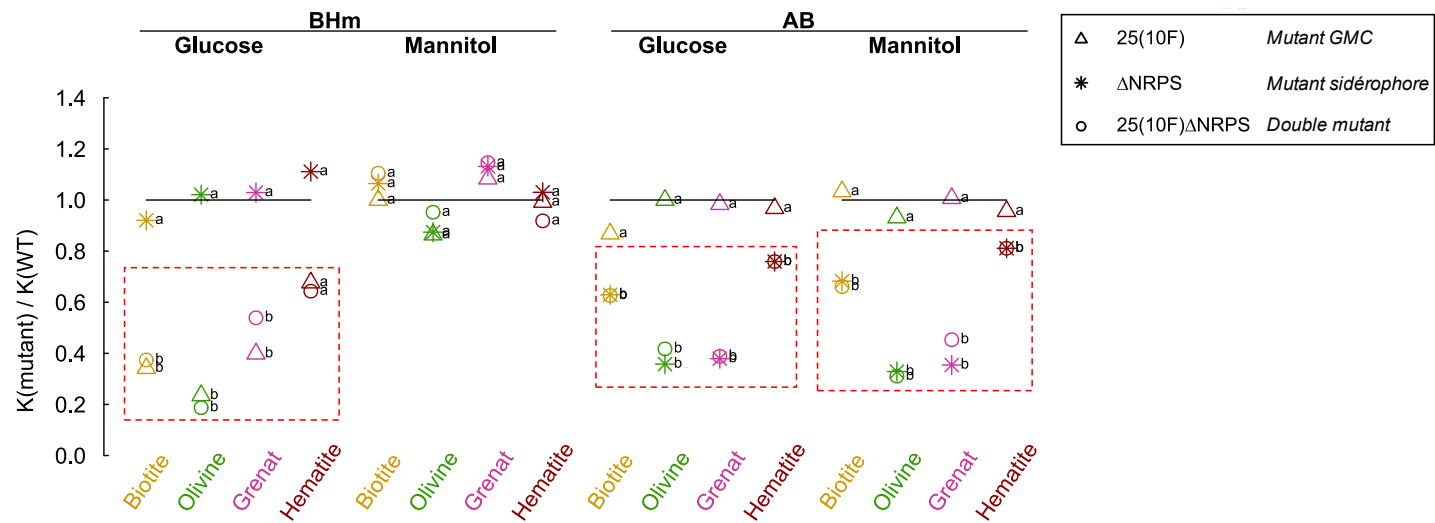


Figure 4.6 : Altération des minéraux par les mutants en fonction du type de minéral comparé à la souche sauvage

Le taux de dissolution du fer pour un minéral altéré par un mutant ($K(\text{mutant})$) a été rapporté à celui obtenu pour la souche sauvage ($K(\text{WT})$). Si le résultat du rapport obtenu est égale à 1, le mutant n'est pas significativement différent de la souche WT pour altérer les minéraux (lettre a). A l'inverse, si le rapport est inférieur à 1, le mutant est significativement différent de la souche WT dans sa capacité à altérer (lettre b). Le trait noir indique le seuil de 1 correspondant au taux de dissolution de la souche sauvage. Les encadrés rouges indique les mutants impactés dans leur capacité à dissoudre les minéraux. Les lettres minuscules indiquent les différences significatives obtenus après comparaison du taux de dissolution du fer des mutants comparés au WT ($P < 0.05$).

confirmé par la comparaison des taux de dissolution entre les mutants et la souche sauvage ($P > 0.05$).

En ce qui concerne le **milieu AB glucose** les rapports R des mutants Δ NRPS et 25(10F) Δ NRPS sont de : 0.63 et 0.63 pour la biotite ; 0.36 et 0.42 pour l'olivine ; 0.38 et 0.39 pour le grenat ; 0.76 et 0.76 pour l'hématite. D'après la comparaison des taux de dissolution des mutants Δ NRPS et 25(10F) Δ NRPS avec ceux de la souche sauvage, les mutants sont significativement différents de la souche sauvage pour tous les minéraux testés ($P < 0.05$). En revanche, le mutant 25(10F) présente des rapports R proches de 1 pour tous les minéraux testés (R = 0.87, 1.0, 0.98 et 0.97 pour la biotite, l'olivine, le grenat et l'hématite respectivement).

Dans le milieu **AB mannitol**, les mêmes mutants ont été impactés dans l'altération des minéraux (*i.e.*, Δ NRPS et 25(10F) Δ NRPS) que dans le milieu AB glucose avec des valeurs de R similaires.

5. Discussion

La forte capacité à altérer les minéraux de la souche modèle *Collimonas pratensis* PMB3(1) a permis d'étudier les mécanismes moléculaires impliqués dans cette fonction. Les études précédentes (CHAPITRE 2 et 3 (Picard *et al.*, 2021a, 2021b)), ont permis de découvrir les deux mécanismes principaux impliqués dans l'altération des minéraux : la GMC impliquée dans l'acidolyse (mutant 25(10F)) et la malléobactine impliquée dans la complexolyse (mutant Δ NRPS). Cette étude avait pour but de déterminer l'influence des facteurs intrinsèques et extrinsèques sur l'efficacité et les mécanismes moléculaires de l'altération des minéraux par les bactéries. Nous avons considéré que la source de carbone (glucose et mannitol) et le pouvoir tampon du milieu (AB et BHm) étaient des facteurs extrinsèques pouvant potentiellement impacter de manière significative l'efficacité d'altération ainsi que les mécanismes moléculaires mis en jeu par la souche modèle. Les facteurs intrinsèques sont représentés par des minéraux (biotite, olivine, grenat et hématite) dont la composition chimique et l'altérabilité sont différentes.

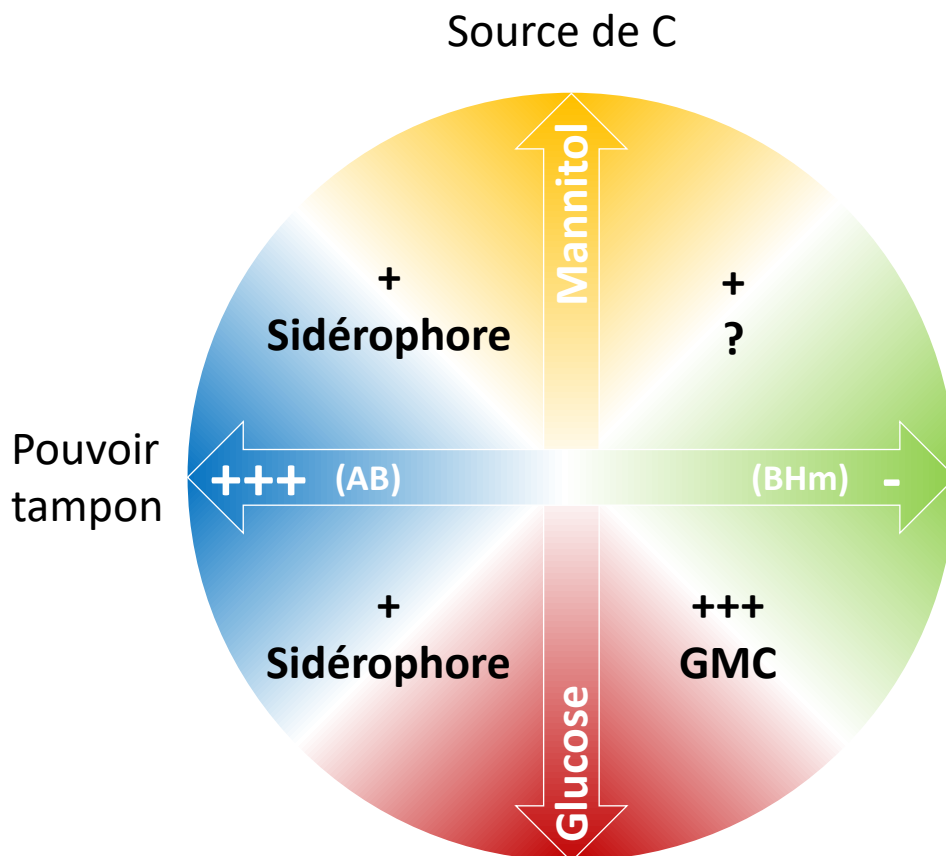


Figure 4.7 : Les mécanismes moléculaires impliqués dans l'altération des minéraux par la souche PMB3(1) en fonction des facteurs environnementaux

Dans un milieu faiblement tamponné (vert) en présence de glucose (rouge), la souche modèle PMB3(1) altère les minéraux par acidolyse *via* la GMC oxidoréductase. Dans cette condition l'altération est la plus efficace (+++). Dans le même milieu en présence de mannitol (jaune), il y a une faible altération des minéraux (+) mais les mécanismes moléculaires impliqués sont inconnus (?). Dans le milieu à fort pouvoir tampon (AB) (bleu), en présence de glucose (rouge) ou mannitol (jaune), la souche modèle altère les minéraux par complexolyse via la production de sidérophore. Ce mécanisme est moins efficace que l'acidolyse (+).

5.1. Les mécanismes moléculaires de l'altération des minéraux influencés par les facteurs extrinsèques

5.1.1. Effet de la source de carbone

Dans un milieu faiblement tamponné et en présence de glucose, la GMC oxydoréductase est l'enzyme majoritairement impliquée dans l'acidolyse des minéraux (Figure 4.7). Cependant cette enzyme nécessite la présence de glucose pour conduire à l'acidification du milieu. En effet, le mutant 25(10F) ne présente pas de différences significatives comparé à la souche WT dans le milieu BHm mannitol ce qui suggère que la GMC n'a plus d'impact sur l'altération des minéraux par la souche PMB3(1) en absence de glucose. Cet effet de la source de carbone sur l'efficacité d'altération des minéraux a été mis en évidence dans d'autres études. De manière générale, le glucose est la source de carbone qui permet l'altération la plus efficace des minéraux par les souches bactériennes testées (Nautiyal *et al.*, 2000; Hameeda *et al.*, 2006; Reyes *et al.*, 2006; Uroz *et al.*, 2007, 2009b; Patel *et al.*, 2008; Suleman *et al.*, 2018). C'est ce qui est effectivement observé dans notre étude dans un milieu peu tamponné (BHm). Cependant, dans un milieu ayant un fort pouvoir tampon tel que le milieu AB, aucun effet de la source de carbone sur l'efficacité d'altération des minéraux par la souche modèle n'a été observé. La source de carbone étant directement lié au métabolisme bactérien, différentes voies métaboliques sont susceptibles d'être mises en place par les bactéries. Ces voies métaboliques, bien que souvent interconnectées, activent certaines enzymes contribuant à l'acidification plus ou moins forte du milieu environnant (par la production de protons et acides organiques). En considérant le glucose, une des voies métaboliques impliquée est celle de l'oxydation directe du glucose (OD). C'est *via* cette voie que la GMC oxydoréductase permet une forte production de protons et de gluconate au niveau du périplasme qui conduit à l'acidification du milieu (Goldstein, 1995; Sashidhar and Podile, 2010; Picard *et al.*, 2021a). A l'inverse, le mannitol implique un métabolisme partiellement acidifiant comme l'attestent les mesures de pH après 7 jours de culture en présence de glucose ou mannitol (pH de 3.4 pour le glucose et 4.3 pour le mannitol). Cette acidification partielle en présence de mannitol se traduit par une faible acidolyse des minéraux. La source de carbone joue donc un rôle important dans l'efficacité d'altération des minéraux par les bactéries, mais cet effet est aussi fortement dépendant des conditions de milieu (tampon).

Hormis l'effet de l'acidolyse, le substrat carboné peut influencer l'efficacité des bactéries à altérer les minéraux en favorisant ou non leur croissance (Kalinowski *et al.*, 2000). L'analyse de la densité bactérienne lors des tests *in vitro* ont montrés que la souche PMB3(1) produisait

une biomasse légèrement plus importante en présence de mannitol qu'en présence de glucose, ces résultats ont également été obtenus lors de tests de croissance *in vitro*. Ce phénomène est d'ailleurs connu pour d'autres souches bactériennes (Rüger and Krambeck, 1994). Cette préférence pour le mannitol concorde avec l'origine écologique de la souche PMB3(1) ; en étroite interaction avec un champignon ectomycorhizien.

Dans le milieu BHm mannitol, il n'y a pas de différence entre les mutants et la souche sauvage, en ce qui concerne l'altération de tous les minéraux. L'altération biotique mesurée est d'ailleurs plus importante que le contrôle avec minéral non-inoculé. Cela suggère que la souche PMB3(1) est capable d'altérer activement les minéraux en présence de mannitol mais les mécanismes moléculaires impliqués ne sont ni la GMC ni la malléobactine. Il existe probablement d'autres mécanismes d'altération encore non-découverts pour la souche *Collimonas pratensis* PMB3(1).

5.1.2. Effet du tampon du milieu

L'effet du pouvoir tampon sur la capacité à altérer les minéraux a été démontré pour deux souches bactériennes (*i.e.*, *Bacillus coagulans* et *Citrobacter koseri*) qui étaient capables de solubiliser le phosphate uniquement dans un milieu non-tamponné (Gyaneshwar *et al.*, 1998). Dans ce chapitre, le taux de dissolution des minéraux testés en BHm glucose est significativement plus élevé (pour la biotite : 3.4 fois ; l'olivine : 2.5 fois ; le grenat : 3.7 fois ; et l'hématite : 1.3 fois) que dans le milieu AB glucose. Ces résultats démontrent donc un effet du pouvoir tampon sur la capacité à altérer de la souche PMB3(1).

Néanmoins, l'effet du pouvoir tampon du milieu sur les mécanismes moléculaires de l'altération n'avait encore jamais été étudié. D'après les comparaisons entre WT et mutants, la GMC oxydoréductase est impliquée dans l'altération des minéraux en présence d'un milieu présentant un faible pouvoir tampon et contenant du glucose. A l'inverse dans un milieu fortement tamponné (AB) supplémenté avec du glucose, la production de sidérophore est un mécanisme important de l'altération dans ces conditions. Ainsi, le pouvoir tampon du milieu a un effet sur les mécanismes moléculaires impliqués dans l'altération.

5.1.3. Effet synergique des mécanismes

Certaines études suggèrent et/ou ont démontré que les sidérophores et les acides organiques pouvaient agir de manière synergique dans le processus de dissolution des minéraux (Reichard *et al.*, 2007; Dehner *et al.*, 2010; Parrello *et al.*, 2016; Lin *et al.*, 2018). Cela a notamment été

démontré en condition abiotique où l'ajout de DFO-B et de différents acides organiques (oxalate, fumarate, malonate, succinate) entraînaient une augmentation de la libération de fer à partir de goethite, mais cet effet n'a pas été observé pour l'association de DFO-B et de citrate (Reichard *et al.*, 2007). La souche PMB3(1) produit principalement du gluconate dans le milieu BHm glucose (Picard *et al.*, 2021a). L'analyse des résultats du double mutant 25(10F) Δ NRPS impacté dans l'activité de la GMC (production de gluconate réduite) et la synthèse de sidérophore a permis de démontrer qu'il n'y avait pas d'effet combiné ni synergique des deux mécanismes dans les conditions testées.

5.2. Les facteurs intrinsèques et l'altération des minéraux par la souche PMB3(1)

Les tests d'altération *in vitro* réalisés en conditions abiotiques ont permis d'évaluer l'altérabilité de chaque minéral en condition d'acido-complexolyse (*i.e.*, HCl et citrate). Ces tests ont révélé que l'olivine était le minéral le plus altérable et son taux de dissolution était comparable à celui de l'apatite. La biotite et le grenat présentaient des taux de dissolution similaire et enfin l'hématite était le minéral le moins altérable. Le classement des minéraux selon leur altérabilité (déterminée dans ces travaux) est présenté ci-dessous :

Olivine \approx *Apatite* > *Biotite* \approx *Grenat* > *Hématite*

Ces valeurs et ce classement sont cohérents avec les données issues de la littérature. La comparaison de l'altérabilité de différents minéraux appartenant à la famille des orthosilicates a ainsi montré que l'olivine était le minéral le plus altérable des orthosilicates (*Olivine* >) (Morton, 1984; Bateman and Catt, 1985; Velbel, 1999). Bateman *et al.* et Brantley ont démontré que les cinétiques d'altération de l'apatite et la forstérite (type d'olivine) étaient similaires (*Olivine* \approx *Apatite*) (Bateman and Catt, 1985; Brantley, 2008). Brantley a également démontré que la cinétique d'altération de la biotite était moins importante que celle de la forstérite (*Olivine* > *Biotite*) (Brantley, 2008). Le grenat est considéré comme un minéral d'altérabilité intermédiaire, il est notamment moins altérable que l'olivine (*Olivine* > *Grenat*) (Bateman and Catt, 1985; Velbel, 1999). Enfin, d'après nos connaissances, il n'existe pas de comparaison d'altérabilité entre l'hématite et les silicates, cependant il a été montré que l'hématite était un des oxydes et hydroxydes de fer les moins altérables avec la goethite (> *Hématite*) (Sidhu, 1981; Schwertmann, 1991).

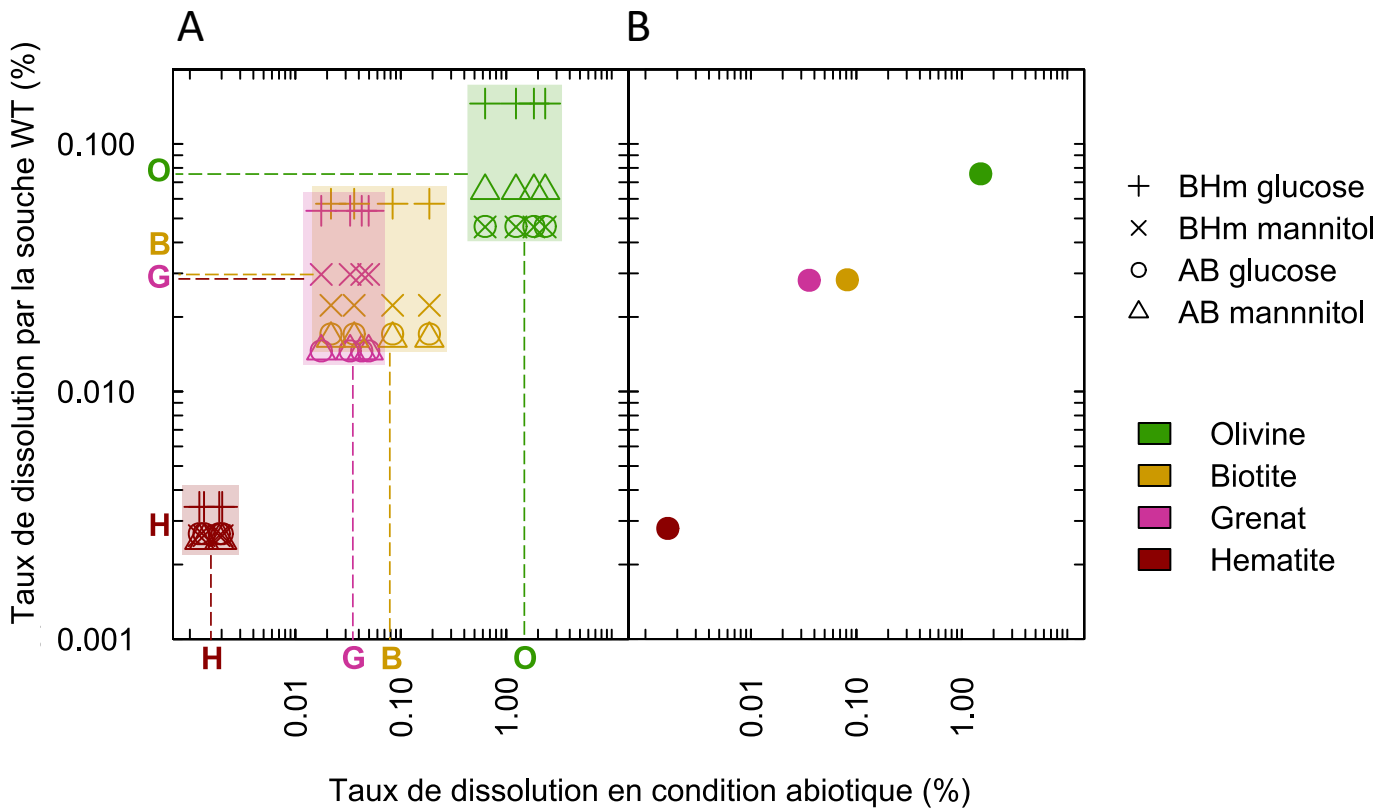
5.2.1. Le cas particulier de l'olivine

Dans la littérature, il a été montré que l'altération de l'olivine par un consortium de bactéries hétérotrophes menait à une dissolution préférentielle de magnésium et silice (Lamérand *et al.*, 2020). Lorsque le magnésium est saturé en solution, il précipite (néoformation) en réagissant avec le CO₂ pour former des carbonates. La précipitation de magnésium en solution suite à la dissolution du minéral a également été démontrée pour d'autres minéraux contenant du magnésium comme la serpentinite (Liu *et al.*, 2021). Dans cette dernière étude, la souche *Bacillus subtilis* acidifie le milieu menant à une libération de magnésium à partir de la serpentinite pendant 6 jours, au septième jour, le magnésium précipite entraînant une augmentation du pH. Les auteurs suggèrent que l'augmentation du pH est due à la précipitation (formation de carbonate) qui consomme des protons (Liu *et al.*, 2021).

Les résultats obtenus lors de la dissolution de l'olivine par la souche PMB3(1) dans un milieu faiblement tamponné (BHm) montrent que le pH est de 6.2 après 7 jours d'incubation alors que l'on sait que dans ce milieu la souche PMB3(1) acidifie à un pH d'environ 3. On peut donc supposer que l'acidification du milieu par la souche PMB3(1) a entraîné la libération de magnésium à partir d'olivine lors des premiers jours d'incubation. Le magnésium arrivant à saturation a probablement précipité avec le CO₂ pour former des carbonates. De plus, l'observation au microscope à épifluorescence du surnageant de culture après 7 jours d'incubation de PMB3(1) avec l'olivine a mis en évidence la présence de précipités non identifiés mais correspondant potentiellement aux carbonates de magnésium. La précipitation du magnésium a probablement capté les protons dans le milieu, jouant un rôle de tampon.

5.3. Relation entre efficacité d'altération des bactéries et altérabilité des minéraux

Nous avons vu plus haut que la souche PMB3(1) altère tous les minéraux testés, mais avec des taux de dissolution variables. La question qui s'est posée est de savoir si l'efficacité d'altération suit ou non l'altérabilité des minéraux ? Autrement dit, est-ce que le minéral le plus altérable sera le minéral le plus altéré par les bactéries ? Cette question peut paraître triviale, néanmoins en considérant la composition chimique des minéraux, on pourrait très bien considérer que certains éléments toxiques modulent cette altération ou que, suivant les conditions, des bactéries peuvent former des biofilms qui inhibent l'altération. C'est d'ailleurs le cas de la souche de *Shewanella oneidensis* MR-1 qui inhibe l'altération de la calcite grâce à la formation de biofilms (Lüttge and Conrad, 2004). La comparaison des taux de dissolution entre les conditions



biotique et abiotique a permis de démontrer qu'il y avait une corrélation entre le taux de dissolution biotique et l'altérabilité du minéral (Figure 4.8). En effet, que ce soit dans les conditions biotiques ou abiotiques, la dissolution de l'olivine était la plus importante, la biotite et le grenat présentait une dissolution similaire et l'hématite était le minéral le moins altérable. Ainsi, plus un minéral est altérable, plus sa dissolution est importante en présence de la souche PMB3(1).

Les tests d'altération biotiques *in vitro* de quatre minéraux présentant une composition chimique et une altérabilité différentes ont démontré que les mêmes mécanismes moléculaires étaient développés par la souche modèle quel que soit le type de minéral. Dans ce cas, les mécanismes moléculaires impliqués ne sont donc pas spécifiques d'un type de minéral.

6. Conclusion

Ces travaux ont permis de démontrer que la souche PMB3(1) est capable d'altérer plusieurs types de minéraux, et ce quelles que soient les conditions environnementales testées. Ces résultats suggèrent qu'une souche efficace pour altérer sera capable d'altérer différents types de minéraux. Néanmoins, l'efficacité des mécanismes moléculaires mis en jeu lors de l'altération varie en fonction du pouvoir tampon et de la source de carbone. Les différences observées pourraient potentiellement être expliquées par différents processus : (i) une expression différenciée des gènes (*gdhC* et *mbaA*) en fonction des conditions du milieu et de la présence du minéral. (ii) une neutralisation ou une non production des agents altérants du fait du pouvoir tampon du milieu et/ou de la présence d'ions en solution (ex : fer).

CHAPITRE 5

Apport des méthodes de transcriptomique et protéomique dans la compréhension des mécanismes engagés dans l'interaction et l'altération des minéraux par la souche *Collimonas pratensis* PMB3(1)

1. Préambule

Les deux mécanismes moléculaires identifiés durant ma thèse et conférant la capacité à altérer les minéraux de la souche *Collimonas pratensis* PMB3(1) sont l'acidolyse *via* l'action d'une GMC oxydoréductase et la complexolyse *via* l'action de la malléobactine. Ces deux agents altérants sont-ils les seuls impliqués dans l'altération des minéraux par la souche modèle ? Sont-ils spécifiques de la présence du minéral et/ou de la disponibilité et du type de nutriment ? Pour avoir une vision plus globale des mécanismes moléculaires impliqués dans l'altération des minéraux et des potentielles régulations, des approches de transcriptomique et protéomique ont été appliquées.

Ces questions ont déjà été abordées par notre équipe sur une autre souche modèle efficace pour altérer les minéraux qui est la souche *Caballeronia mineralivorans* PML1(12) (Uroz *et al.*, 2020). Cet article dont je suis co-auteure, présenté en Annexe 1, a permis d'étudier les premiers stades d'interaction entre bactéries et minéraux.

CONTRIBUTION : Dans ce chapitre, j'ai réalisé le design expérimental ainsi que les expérimentations y compris l'extraction d'ARN. L'extraction protéique a été effectuée par l'équipe de Jean Armengaud et la mesure des acides organiques a été réalisée par le laboratoire LIEC. J'ai participé à l'analyse du jeu de données de transcriptomique et protéomique avec l'aide de Stéphane Uroz et Lucas Auer.

2. **Article 5 : Dual transcriptomics and proteomics analyses of the early stage of interaction between *Caballeronia mineralivorans* PML1(12) and mineral**

S. Uroz, L. Picard, M. P. Turpault, L. Auer, J. Armengaud, P. M. Oger
Environmental Microbiology (2020)
<https://doi.org/10.1111/1462-2920.15159>

RESUME : Les minéraux et roches représentent un réservoir essentiel d'éléments nutritifs pour le fonctionnement à long terme des écosystèmes forestiers développés sur des sols pauvres en nutriments. Des bactéries efficaces dans l'altération des minéraux ont été isolées au niveau de la rhizosphère de différentes plantes, mais les mécanismes moléculaires impliqués restent à découvrir. Pour élucider les mécanismes moléculaires impliqués dans l'altération des minéraux

par la souche de *Caballeronia mineralivorans* PML1(12), des approches de transcriptomique et protéomique combinées à des analyses géochimiques et physiologiques ont été réalisées. Cette étude s'est notamment focalisée sur les premières étapes de l'interaction entre minéraux et bactéries. Nous avons identifié des gènes et protéines différentiellement exprimés/produites : (i) quand l'environnement est carencé en certains éléments nutritifs (*i.e.*, Mg et Fe), (ii) en présence d'un minéral, (iii) lorsque la source de carbone diffère (*i.e.*, glucose ou mannitol). L'intégration de ces données démontrent que la souche de PML1(12) est probablement capable de (a) mobiliser du fer *via* la production d'un sidérophore indépendant du système NRPS (non-ribosomal peptide synthetase), (b) induire des systèmes de chimiotactisme et motilité en réponse à la disponibilité en nutriments et (c) acidifier fortement son environnement en présence de glucose en utilisant une Glucose/Méthanol/Choline oxydoréductase, processus conduisant à l'altération des minéraux. Ces résultats apportent de nouvelles informations sur les mécanismes moléculaires impliqués dans l'altération des minéraux et leur régulation chez les bactéries. Cette étude suggère également la mise en place d'une suite d'événements complexes développés par les bactéries pour altérer les minéraux.

Mots clés : altération des minéraux, *Caballeronia mineralivorans*, transcriptomique, protéomique, géochimie

CONTRIBUTION : Mon implication dans cette étude a été limitée comparativement aux autres articles présentés dans cette thèse où je suis première auteure. J'ai réalisé certains tests physiologiques sur la souche *Caballeronia mineralivorans* PML1(12) (tests de croissance) et participé à l'analyse des données préliminaires de transcriptomique et protéomique. Enfin, j'ai relu la version finale de l'article.

2.1. Présentation succincte de l'article

Dans cette section, une présentation succincte de cet article et des focus sur certains aspects en lien avec ma thèse sont proposés (totalité de l'article en Annexe 1).

2.1.1. Le design expérimental

L'expérience a été réalisée en Erlenmeyer contenant 45 ml de milieu BHm carencé en fer et magnésium et supplémenté avec 2 g de biotite (200 à 500 μm). Ces microcosmes ont été

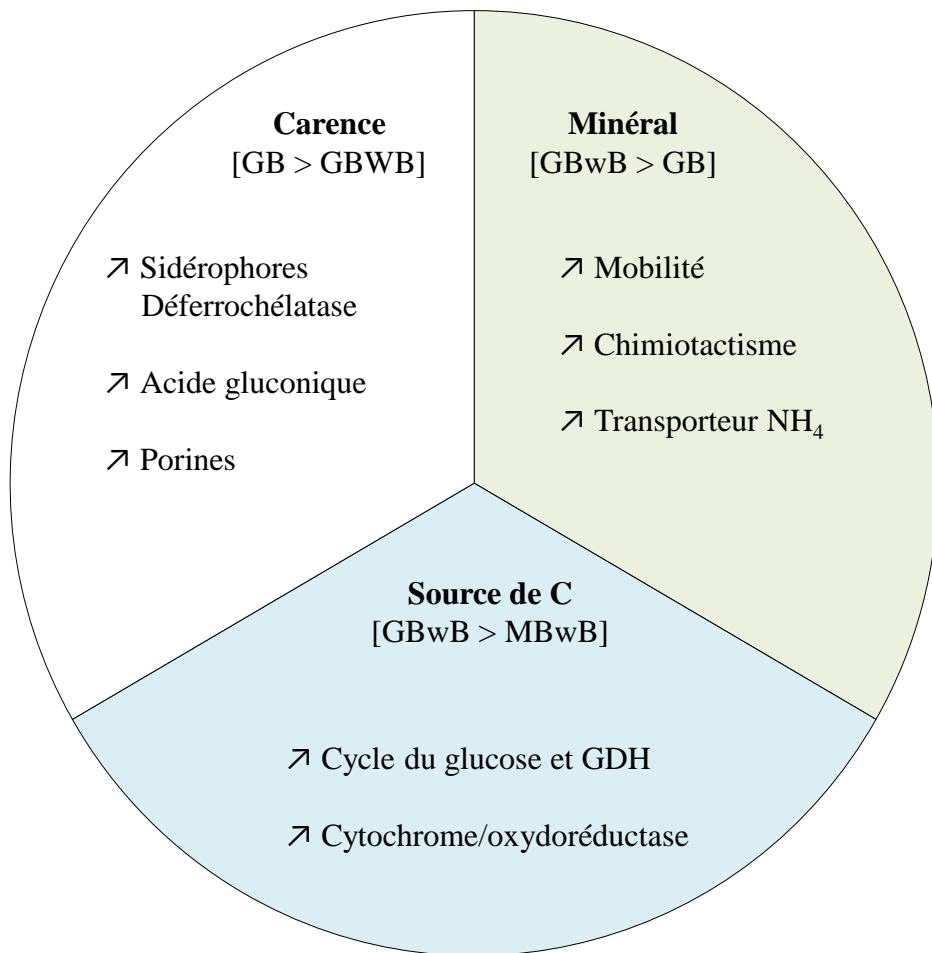


Figure 5.1 : Les grandes fonctions différenciellement régulées par la souche *Caballeronia mineralivorans* PML1(12) en présence ou absence de biotite et en fonction de la source de carbone

GB : BHm carencé en Fe et Mg supplémenté avec du glucose sans minéral

GBwB : BHm carencé en Fe et Mg supplémenté avec du glucose avec minéral

MBwB : BHm carencé en Fe et Mg supplémenté avec du mannitol avec minéral

inoculés avec 5 ml de suspension bactérienne (la souche sauvage) calibrée à $DO_{595nm} = 0.9$. Trois traitements ont été réalisés (GB, GBwB et MBwB) pour répondre à différents questionnements :

- **GB** : Pour observer l'adaptation de la souche bactérienne à la carence en fer et magnésium, la souche PML1(12) a été inoculée dans un milieu BHm avec **glucose** (2 g/l) **sans biotite**.
- **GBwB** : Pour étudier son adaptation à la présence d'un minéral, la souche PML1(12) a été inoculée dans un milieu BHm avec **glucose** et **biotite**.
- **MBwB** : Enfin pour observer l'effet du métabolisme, la souche PML1(12) a été inoculée dans un milieu BHm avec **mannitol** (2 g/l) et **biotite**.

Les ARNs totaux ont été extraits au laboratoire et traités par la société Genwizz. Les protéines ont été obtenues à partir de culots cellulaires envoyés à la plateforme Li2D dirigé par Jean Armengaud. La concentration des ions K, Na, P, Ca, Mg, Fe et Al en solution a été mesurée sur la plateforme de l'unité BEF (UR1138), les acides organiques sur la plateforme du LIEC et le pH du milieu au laboratoire.

2.1.2. Les principaux résultats

2.1.2.1. Les analyses chimiques

Les analyses ont révélé qu'en condition de carence (GB), le pH du milieu était de 2.78 et la quantité de gluconate mesurée dans le surnageant était d'environ 850 mg/l. En présence de biotite et glucose (GBwB), le pH était de 2.77 et la quantité mesurée de gluconate était d'environ 600 mg/l. Le fer libéré dans le milieu à partir de la dissolution de la biotite était de 1.54 mg/l. En présence de biotite et mannitol (MBwB), le pH était significativement plus faible (pH = 4.03) comparé aux autres conditions et la production de gluconate était nulle. Le fer issu de la dissolution de la biotite dans cette condition (MBwB) était de 0.27 mg/l (Tableau 1 de l'Annexe 1).

2.1.2.2. Les gènes différentiellement régulés en fonction des traitements

De manière générale, les approches combinées de transcriptomique et protéomique associées aux analyses des données par DeSEQ2 et MixOmics ont permis d'identifier quelques grandes fonctions régulées (Figure 5.1). En comparant les conditions avec minéral (GBwB) ou sans

Tableau 5.1 : Inventaire des enzymes faisant parti de la famille des glucose/méthanol/choline oxidoréductases (GMC) et des alcool déshydrogénases retrouvées dans le génome de la souche *Caballeronia mineralivorans* PML1(12)

NCBI	N° accession		Product	Putative		
	MAGE	Nom		Localization	Cofactor	Substrate
KLU21389.1	BGPML12v1_53603	ADH-PQQ1	PQQ-dependent dehydrogenase, methanol/ethanol family	Periplasmic	PQQ	Methanol
KLU25669.1	BGPML12v1_41942	ADH-PQQ2	putative pqq-dependent methanol dehydrogenase xoxF	?	PQQ	methanol
KLU26637.1	BGPML12v1_40725	ADH-PQQ3	putative pqq-dependent glucose dehydrogenase	Periplasmic	PQQ	glucose
KLU25168.1	BGPML12v1_10044	GMC1	Gluconate 2-dehydrogenase subunit 3	Membrane	FAD/NAD	gluconate
KLU25169.1	BGPML12v1_10045	GMC1	GMC family oxidoreductase			
KLU25170.1	BGPML12v1_10046	GMC1	Gluconate 2-dehydrogenase cytochrome c subunit			
KLU25980.1	BGPML12v1_41485	GMC2	Gluconate 2-dehydrogenase subunit 3	Membrane	FAD	gluconate
KLU25979.1	BGPML12v1_41484	GMC2	GMC family oxidoreductase (FAD)			
KLU25978.1	BGPML12v1_41483	GMC2	Gluconate 2-dehydrogenase cytochrome c subunit			
KLU25342.1	BGPML12v1_42242	GMC3	putative sorbitol dehydrogenase Tat signal	membrane	FAD/NAD	glucose
KLU25343.1	BGPML12v1_42243	GMC3	Glucose methanol choline dehydrogenase fhdl			
KLU25344.1	BGPML12v1_42244	GMC3	cytochrome C putatively associated to GMC or Gluconate dehydrogenase cytochrome subunit			
KLU26513.1	BGPML12v1_40857	GMC4	Glucose-methanol-choline (GMC) oxidoreductase:NAD binding site	?	NAD	?

(GB), les gènes responsables de la mobilité, du chimiotactisme et du transport d'ammonium ont paru surexprimés en présence du minéral (GBwB). En considérant l'effet de carence du milieu (GB) comparé à GBwB, les gènes impliqués dans l'acquisition de fer (sidérophore, déferrochélatase), la production d'acide gluconique et la synthèse de porines ont paru surexprimés en condition de carence en Mg et Fe (GB). Enfin, l'étude de l'effet de la source de carbone (comparaison glucose (GBwB) vs mannitol (MBwB)) a révélé que les gènes impliqués dans le métabolisme du glucose, ainsi que les gènes de synthèse de cytochromes et d'enzymes oxydoréductrices, étaient surexprimés en présence de glucose.

2.1.2.3. Focus sur les probables glucose déshydrogénases de PML1(12) et leur potentielle fonction dans l'altération des minéraux

D'après l'analyse de son génome, la souche PML1(12) possède 4 GMC oxydoréductases appelées GMC1/2/3 et 4 (Tableau 5.1). Les GMC1 à GMC3 présentent une structure en sous-unités (petite, large et cytochrome) contrairement à la GMC4 qui n'est formée que d'un seul gène. Ces GMC sont *a priori* dépendantes du cofacteur FAD ou NAD. La mise en évidence au niveau génomique des GMCs de la souche PML1(12) a coïncidé avec mes travaux réalisés sur la GMC de la souche PMB3(1) de *Collimonas* et son rôle dans la production d'acide gluconique, l'acidification et l'altération des minéraux ((Picard *et al.*, 2021a), CHAPITRE 2). Ce point est important car les GMCs englobent une grande famille de protéines capables d'utiliser des substrats tels que le sorbitol, le gluconate et pour certaines le glucose (Cavener, 1992; Sützl *et al.*, 2019). En dehors de ces GMC oxydoréductases, trois alcool déshydrogénases PQQ dépendantes (ADH-PQQ1,2 et 3) ont également été identifiées dans le génome ainsi que les gènes de synthèse du cofacteur PQQ (Tableau 5.1). Cette analyse a donc révélé que la souche PML1(12) possédait plusieurs enzymes et types d'enzymes susceptibles de produire de l'acide gluconique et de conduire au phénomène d'acidolyse en présence de glucose.

L'analyse du transcriptome *via* Deseq2 a révélé deux points importants pour ces différentes enzymes : (i) les gènes codant les ADH-PQQ ont un taux d'expression faible qui ne varie pas en fonction des conditions expérimentales, tout comme les gènes de synthèse de PQQ. (ii) Le niveau d'expression des gènes codant les GMCs est plus important que celui des gènes de synthèse des ADH-PQQ. Parmi les 4 GMCs, l'expression du gène codant la GMC4 ne varie pas en fonction des conditions de l'expérience. Une corrélation négative a été observée entre la production de gluconate et l'expression des gènes codant la GMC2. Cette enzyme a paru

surexprimée en présence de mannitol (MBwB). L'expression des gènes codant la GMC1 et 3 est corrélée positivement à la production de gluconate. Ces deux enzymes sont surexprimées en présence de glucose dans les conditions GB et GBwB et la GMC1 avait le taux d'expression le plus élevé. Ces résultats indiquent que la production de gluconate par la souche PML1(12) est probablement due aux GMC oxydoréductases 1 et 3 et non aux enzymes PQQ-dépendantes qui est faiblement exprimées. Il est à noter ici que l'enzyme GMC3 de la souche PML1(12) est également celle qui a le plus d'homologie avec la GMC identifiée pour la souche de *Collimonas* PMB3(1) (70 % d'identité entre les séquences protéiques des grandes sous-unités (GdhL)), chez laquelle une seule GMC à 3 sous-unités a été identifiée.

2.1.2.4. Focus sur les systèmes d'acquisition du fer de PML1(12)

L'analyse des traitements avec ou sans fer a permis de découvrir les mécanismes d'acquisition du fer dans des processus de recyclage intracellulaire ou *via* des mécanismes extracellulaires. Il est ainsi apparu que des gènes impliqués dans la re-mobilisation du fer intracellulaire comme la thioredoxine associée à la bactioferritine ainsi que la déferrochélatase (Andrews *et al.*, 2003) étaient surexprimés en carence de fer (GB) comparativement au traitement avec biotite (GBwB) dans lequel une quantité de fer est libérée de manière passive.

De manière intéressante un homologue d'un gène impliqué dans la synthèse de sidérophore atypique a été identifié. Ce gène présentant une homologie avec le gène *iucA/iucC* a paru surexprimé uniquement en carence de fer (GB). Ce gène candidat appartient à un cluster de gènes codant pour un sidérophore de type NRPS-indépendant (NIS). Cette synthétase indépendante du système NRPS a été décrite dans d'autres souches bactériennes comme responsable de la condensation du citrate (ou dérivé) avec un groupe amine ou alcool et enfin du déplacement d'un intermédiaire citryl (Carroll and Moore, 2018). Ce type de gène a été identifié dans différentes souches bactériennes de *Pseudomonas*, *Massilia*, *Rasltonia* ou *Sinorhizobium* et autres *Burkholderia* mais la molécule produite a rarement été caractérisée.

2.1.3. Conclusion

Cette étude a permis de mieux comprendre la régulation des gènes lors de l'interaction bactéries/minéral et l'altération des minéraux par la souche modèle PML1(12) et ce dans le premier stade d'interaction avec la biotite. Notamment, les mécanismes moléculaires impliqués dans la chélation du fer (système NIS) et l'acidification (différentes GDH) semblent régulés de

différentes manières en fonction de la présence ou absence du minéral et de la disponibilité en Mg et Fe et représentent des candidats intéressants pour la suite des travaux. De manière intéressante, cette étude a montré que les GMC oxydoréductases semblaient jouer un rôle dans la capacité de la souche de PML1(12) à altérer les minéraux du fait de leur forte expression et production au niveau protéique. Au contraire, la faible expression et la non régulation des gènes codant les alcool déshydrogénases PQQ-dépendantes suggèrent que ces alcool déshydrogénases PQQ dépendantes n'utilisent pas le glucose ou ne sont pas impliquées dans le processus d'altération chez PML1(12).

Cependant, cette étude s'est focalisée sur une seule souche modèle à un temps donné considéré comme un stade précoce de l'interaction entre bactéries et minéraux (T = 20h). La question se pose donc de la généralité des résultats et de la dynamique des événements au cours du temps.

2.2. Parallèle entre l'étude présentée ci-dessus et mes travaux de recherche

2.2.1. Intérêt d'étudier ces questions de recherche sur la souche modèle *Collimonas pratensis* PMB3(1)

Ces deux souches modèles (PML1(12) et PMB3(1)) ont une écologie différente. Bien qu'isolées dans le même environnement (mycorrhizosphère de *Scleroderma citrinum* associé au chêne), elles ne proviennent pas du même compartiment. En effet, la souche PMB3(1) a été isolée de l'intérieur du manchon symbiotique et était donc en étroite interaction avec le manteau fongique. La souche PML1(12) est issue de la surface du manchon symbiotique avec une relation moins forte avec le champignon (Uroz *et al.*, 2007). Ces différences de compartiments sous-entendent probablement un accès différent aux exsudats racinaires et fongiques et donc potentiellement un métabolisme différent. Les potentiels métaboliques ont été évalués *via* les plaques BIOLOG et l'analyse des résultats a révélé des différences substantielles (Uroz *et al.*, 2007). En dehors de ces aspects liés à la niche d'origine et aux interactions bactéries/champignons, la souche PML1(12) appartient à un genre abondamment retrouvé dans les sols forestiers, que ce soit par approche métagénomique ou cultivable, tandis que la souche PMB3(1) appartient à un genre considéré comme faisant partie de la biosphère rare.

D'un point de vue de leur potentiel d'altération, la souche PMB3(1) est capable d'altérer la biotite de manière plus efficace en présence de glucose, mannitol ou tréhalose comparés à la souche PML1(12) (Uroz *et al.*, 2009b).

Au niveau moléculaire, la souche PML1(12) présente un génome d'environ 9 Mb comprenant 2 ou 3 chromosomes tandis que la souche PMB3(1) a un génome plus petit d'environ 6 Mb sur

un chromosome. Enfin, la souche PML1(12) possède dans son génome plusieurs alcool déshydrogénases dont certaines appartenant à la famille des GMC oxydoréductases ou des alcool déshydrogénases (dont une probable GDH-PQQ) alors que la souche PMB3(1) ne possède pas de GDH-PQQ ni de gènes de synthèse de PQQ.

Ces différences au niveau de leur écologie, de leur potentiel d'altération et de leur génome, nous ont conduit à étudier la souche PMB3(1), avec l'idée que les mécanismes moléculaires de l'altération et les régulations associées pouvaient être différents chez un autre taxon.

2.2.2. Les nouvelles questions de recherches abordées dans la suite de ce chapitre

L'étude présentée plus haut visait à répondre aux questions de recherche suivantes : quels sont les gènes régulés en fonction de (i) la présence d'un minéral, (ii) la carence du milieu, (iii) la source de carbone ? Les questions de recherche que j'ai abordées dans ce chapitre sont légèrement différentes, mais restent centrées sur la carence en éléments nutritifs. Ce choix est justifié par les caractéristiques des sols des écosystèmes forestiers des régions tempérées qui sont pauvres en nutriments. Dans ce contexte, j'ai choisi d'étudier les gènes régulés chez la souche *Collimonas pratensis* PMB3(1) en fonction de (i) la présence d'un minéral, (ii) la disponibilité en nutriments et également (iii) l'évolution de cette régulation au cours du temps.

2.2.3. Interaction entre bactéries et minéraux, les intérêts d'une étude en cinétique

Le temps 20 h a été choisi pour étudier l'interaction de la souche PMB3(1) avec la biotite. Ce temps est justifié par différents points techniques et conceptuels qui ont aussi régi le design expérimental de l'expérience réalisée avec la souche PML1(12): (i) être capable de mesurer une altération, (ii) avoir un minimum de croissance de la souche testée sans atteindre un plateau, (iii) avoir suffisamment de biomasse pour extraire des ARNs et des protéines, (iv) être dans les premiers stades de l'interaction bactéries/minéral et (v) comparer les résultats obtenus entre la souche PML1(12) et la souche PMB3(1).

J'ai aussi choisi de considérer différents temps en plus de ce stade précoce pour les raisons explicitées en dessous. L'altération des minéraux permet la libération d'éléments chimiques en solution et consomme des protons. L'altération des minéraux entraîne donc des modifications au cours du temps du pH de la solution, de la disponibilité des nutriments inorganiques en

solution et des propriétés de surface du minéral. Ces différents changements peuvent potentiellement induire une régulation des mécanismes moléculaires mis en place par les bactéries pour interagir avec le minéral, mobiliser les nutriments *via* l'altération et plus globalement s'adapter aux conditions de leur milieu. Pour tester cette hypothèse, une approche en cinétique a été envisagée aux temps 20 h, 44 h et 68 h.

3. Introduction

La majorité des sols forestiers des régions tempérées sont pauvres en nutriments inorganiques et présentent des pH très acides ou au contraire très basiques. Dans ce contexte, les minéraux et roches représentent une des principales source de nutriments inorganiques avec les dépôts atmosphériques et la matière organique (Ranger and Turpault, 1999). L'altération des minéraux joue donc un rôle important car elle permet de libérer des nutriments inorganiques (*i.e.*, P, Mg, Ca, Fe...) présents dans la structure cristalline des minéraux. L'altération des minéraux peut être due à des processus abiotiques (*i.e.*, action de l'eau, du vent...) ou biotique (*i.e.*, plantes, champignons, bactéries). Parmi les acteurs biotiques, les bactéries sont capables d'altérer les minéraux *via* différents processus.

La présence de bactéries capables d'altérer les minéraux a été rapportée dans différents environnements comme le sol, la rhizosphère ou la mycorrhizosphère. Cependant, il a été démontré que la proportion de bactéries altérantes dans une communauté pouvait varier en fonction de différents paramètres (*i.e.* la niche occupée (rhizosphère *vs* sol), le type de minéral, les saisons, l'horizon de sol et le type de sol...). Parmi ces facteurs on peut noter la disponibilité en nutriments (*i.e.*, Mg, K, Ca, P...) qui semble jouer un rôle dans la proportion de bactéries altérantes au sein d'une communauté. Notamment, certaines études se sont intéressées à l'effet de l'amendement des sols sur les communautés bactériennes et la proportion des bactéries altérantes. Une expérience en microcosme a permis de démontrer qu'un apport en K ou Mg entraînait une diminution de la proportion des bactéries altérantes (par rapport à la condition non-amendée) et ce dès les 15 premiers jours de l'amendement (Nicolitch *et al.*, 2019). D'autres études *in situ* ont également montré que l'apport de nutriments inorganiques sous une forme biodisponible (phosphate, dolomite) avait pour conséquence une diminution de la proportion des bactéries efficaces pour altérer les minéraux par rapport au sol non-amendé (Mander *et al.*, 2012; Lepleux *et al.*, 2013; Widdig *et al.*, 2019). En général, il semblerait que la proportion de bactéries altérantes soit plus importante dans des milieux présentant une faible disponibilité en éléments nutritifs. Cela pourrait être expliqué par des mécanismes d'enrichissement des

bactéries les plus adaptées à leur environnement, dans ce cas, les bactéries capables d'acquérir des nutriments inorganiques à partir des minéraux seraient avantagées dans un environnement pauvre en éléments nutritifs. A l'inverse, les mécanismes moléculaires de l'altération des minéraux pourraient représenter un fardeau métabolique dans un environnement où les nutriments inorganiques sont déjà disponibles. D'un autre point de vue, les différences de communautés bactériennes altérantes en fonction de la disponibilité en nutriments pourrait être expliquée par une régulation des mécanismes moléculaires de l'altération.

En ce qui concerne ce dernier point, la question de la régulation des gènes en fonction de la disponibilité en phosphate a été abordée par deux études sans *a priori*. Zeng *et al.* ont étudié l'expression des gènes de *Burkholderia multivorans* WS-FJ9 en fonction de concentrations croissantes en phosphate (0, 5 et 20 mM) (Zeng *et al.*, 2017). Bien que cette étude n'ait pas été centrée sur la question des mécanismes moléculaires de l'altération des minéraux, elle permet de tirer des informations pertinentes car la souche WS-FJ9 a été décrite pour sa capacité à solubiliser le P inorganique. Par une analyse de transcriptomique couplée à des PCR quantitatives, les auteurs ont pu identifier des gènes différentiellement exprimés ; certains étaient surexprimés en présence de phosphate comme une protéine de flagelle, une isomérase SurA, une tyrosine kinase, et d'autres étaient réprimés en présence de phosphate comme la glycérate kinase, la 2-oxoglutarate déshydrogénase, l'histidine kinase ou un transporteur ABC de sucre. De manière intéressante, les auteurs ont évoqué la sous-expression d'une GMC oxydoréductase en présence de phosphate. Dans la même problématique, Brito *et al.* ont étudié la régulation des gènes de *Paenibacillus sonchi* (elle aussi capable de solubiliser le P inorganique (Pi)) en fonction de la présence de phosphate soluble ou insoluble (Brito *et al.*, 2020). Les analyses de transcriptomique ont permis de révéler que les gènes surexprimés en présence de phosphate insoluble étaient impliqués dans la mobilité et la synthèse de thiamine. A l'inverse, les gènes réprimés en présence de phosphate insoluble, étaient liés à la synthèse de sidérophore, le stockage de carbohydrate et une 2-oxoglutarate déshydrogénase.

Si, à l'échelle des communautés microbiennes, l'effet du minéral et ses propriétés physico-chimiques a commencé à être démontré (*i.e.*, effet minéralosphère (Uroz *et al.*, 2015)), les démonstrations à l'échelle cellulaire sont peu fréquentes. La disponibilité en nutriments est pourtant connue pour déclencher l'expression de certains mécanismes comme décrit plus haut. La présence physique du minéral pourrait donc également conduire à la régulation de l'expression des gènes, certains pouvant être impliqués dans l'altération des minéraux par les bactéries. Cette question a été abordée par Olsson-Francis *et al.* qui se sont intéressés particulièrement à l'expression des gènes de la souche *Cupriavidus metallidurans* CH34 en

présence de basalte dans un milieu carencé ou non en fer. Par une technique de puces à ADN, ils ont pu détecter la présence de sidérophores seulement lorsque la souche était en condition de carence sans minéral. L'absence de sidérophore en présence du minéral est probablement due à une dissolution passive du basalte libérant du fer dans le milieu et inhibant la synthèse de sidérophore. Les auteurs suggèrent que d'autres mécanismes d'acquisition du fer sont développés en présence du minéral comme des porines exprimées en condition de carence avec ou sans minéral ou des transporteurs ABC exprimés en milieu carencé avec basalte. De plus, malgré la faible concentration en ces éléments chimiques dans le basalte, la présence de minéral semble entraîner l'expression d'un système de résistance aux métaux lourds (cadmium, zinc et cobalt). Ces résultats suggèrent donc que la souche bactérienne détecte la présence du minéral comme une source de stress (Olsson-Francis *et al.*, 2010). Un design expérimental très proche a été réalisé par Bryce *et al.* qui avait pour but d'étudier la régulation des protéines en fonction d'une carence en fer ou magnésium et de la présence de basalte par la souche de *Cupriavidus metallidurans* CH34. En plus des conclusions déjà proposées par Olsson-Francis *et al.*, l'analyse protéomique a révélé que la présence du minéral avait un effet plus important sur la régulation de la production de protéines par rapport à un effet de carence (Bryce *et al.*, 2016). D'autres études ont analysé la régulation des gènes lors d'une interaction bactérie-minéral tels que les travaux de Uroz *et al.* qui ont eu pour objectif de déterminer l'effet de la carence, de la présence d'un minéral et de la source de carbone sur la régulation des gènes de la souche de *Caballeronia mineralivorans* PML1(12) ((Uroz *et al.*, 2020) ; Annexe 1). En combinant des approches de transcriptomique et protéomique, ces auteurs ont pu montrer une expression différentielle de certains gènes liés à l'acidification et à la chélation du fer en fonction des différents traitements ((Uroz *et al.*, 2020) ; détails présentés ci-dessus §2). Enfin, Liu *et al.* ont voulu étudier l'expression des gènes en fonction de deux phénomènes liés à l'interaction entre *Bacillus subtilis* et la serpentinite : (i) une phase initiale (jour 1) de dissolution de la serpentinite et (ii) une phase de précipitation liée aux changements des conditions chimiques du surnageant (saturation ; jour 7). Des analyses de protéomique ont permis d'identifier des protéines différentiellement produites en fonction de ces deux traitements. Les protéines surexprimées lors de la dissolution (jour 2) par rapport à la carbonatation (jour 7) étaient liées à des processus d'oxydoréduction ou à la synthèse d'acides organiques qui pourraient correspondre aux principaux mécanismes moléculaires de l'altération de la serpentinite par la souche de *Bacillus*. Tandis que lors de la carbonatation (jour 7), des protéines impliquées dans le transport d'ions sont sur-produites (Liu *et al.*, 2021). Ces quelques études indiquent que la disponibilité en nutriments (Fe et/ou Mg) et la présence d'un minéral (biotite, basalte et serpentinite) influence

l'expression de gènes potentiellement liés à l'altération des minéraux. Mais seulement trois souches bactériennes (des genres *Cupriavidus*, *Caballeronia* et *Bacillus*) ont été testées jusqu'alors sur ces questions.

Etant donné que la disponibilité en nutriments inorganiques influence la régulation des gènes des bactéries, la modification de la concentration en éléments chimiques de la solution au cours du temps, suite à l'altération du minéral, pourrait potentiellement entraîner une régulation de l'expression des gènes de l'altération. En effet, les mécanismes mis en place par les bactéries entraînent une dissolution des minéraux qui libèrent leur contenu chimique dans la solution. La dissolution d'un minéral par un agent altérant est un processus continu tant qu'il y a des agents altérants et que la solution n'est pas saturée. De ce fait, la concentration des éléments issus de la dissolution du minéral augmentent en solution au cours du temps. L'augmentation progressive de la concentration en éléments chimiques par les minéraux pourrait donc entraîner des régulations des gènes des bactéries qui s'adaptent aux nouvelles conditions environnementales. De ce fait, étudier la régulation des gènes lors de la dissolution des minéraux par les bactéries au cours du temps pourrait permettre de comprendre comment les bactéries modulent l'expression de leurs gènes face à la présence du minéral et aux éléments chimiques libérés par la dissolution de ce minéral. Or, cette question n'a encore jamais été étudiée et fait l'objet de ce chapitre.

Dans ce chapitre, deux facteurs potentiellement impliqués dans la régulation des gènes de l'altération des minéraux ont été considérés : (i) la disponibilité en nutriments (milieu carencé vs milieu non carencé) et (ii) la présence du minéral (milieu carencé vs milieu carencé + minéral porteur des nutriments manquants). Pour étudier ces deux aspects, la souche modèle de *Collimonas pratensis* PMB3(1) a été choisie pour sa forte capacité à altérer les minéraux et son origine écologique. Le but de cette étude était : (i) de découvrir de potentiels nouveaux gènes impliqués dans l'interaction bactéries/minéral et l'altération des minéraux, (ii) d'évaluer l'effet d'une carence (Mg et Fe) (iii) d'évaluer l'effet de la présence d'un minéral et (iv) d'évaluer l'effet de la disponibilité en nutriments sur la régulation des gènes de la souche modèle au cours du temps. Des expériences de transcriptomique (uniquement à 20 h) et protéomique couplées à des analyses chimiques ont permis de suivre l'altération de la biotite par la souche modèle et la régulation de l'expression des gènes de cette souche après 20, 44 et 68 h d'incubation. Au niveau de l'analyse bioinformatique des données, deux approches complémentaires ont été réalisées : (i) une approche sans *a priori* donnant une vision globale du jeu de données et (ii) une approche avec *a priori* basée sur notre état actuel de connaissances et permettant de centrer

l'analyse sur des gènes d'intérêt comme certains gènes liés au métabolisme du glucose (ex : GMC oxydoréductase) et des gènes responsables de l'acquisition du fer (ex : malléobactine).

A noter, les données de transcriptomique et de protéomique ont été reçues au mois d'août 2021, les résultats présentés dans ce chapitre sont donc préliminaires car l'analyse des données est encore en cours. Je me suis donc principalement concentrée sur le temps de 20 h pour lequel plusieurs méthodes ont été utilisées (transcriptomique et protéomique).

4. Matériels et méthodes

Le « matériels et méthodes » rédigé ci-dessous présente le design expérimental ainsi que les différentes analyses réalisées pour les 3 temps considérés.








4.1. Matériel biologique

La souche modèle *Collimonas pratensis* PMB3(1) a été choisie pour sa forte capacité à altérer les minéraux et son origine écologique (CHAPITRE 1 §2 (Calvaruso *et al.*, 2007; Uroz *et al.*, 2007)). La souche est conservée dans un stock de glycérol 40% à -80 °C et est cultivée à 25 °C dans du milieu AB mannitol ((Chilton *et al.*, 1974) ; Annexe 2) ou Bushnell-Hass (Annexe 2) modifié (BHm) carencé en Fe et Mg ou complet (voir en dessous) (Uroz *et al.*, 2007).

4.2. Matériel minéral

La biotite utilisée dans cette étude provient de Bancroft (Canada) et est un phyllosilicate (2:1) fréquemment retrouvé dans les sols forestiers. Elle contient des éléments chimiques tels que K, Mg et Fe faisant de ce minéral une source intéressante de nutriments inorganiques pour la biosphère du sol. La biotite utilisée est un minéral pur et homogène de composition chimique : 41.01 % SiO₂ ; 10.90 % Al₂O₃ ; 13.26 % Fe₂O₃ ; 0.27 % MnO ; 18.90 MgO % ; 0.41 % Na₂O ; 9.46 % K₂O ; 2.28 % TiO₂ qui a été déterminée par spectrométrie à plasma à couplage inductif (ICP-AES) après une fusion alcaline avec du LiBO₂ et une dissolution au HNO₃. Sa structure chimique est (Si₃A₁₁) (Fe³⁺_{0.12} Fe²⁺_{0.61} Mg_{2.06} Mn_{0.02} Ti_{0.13}) et K_{0.88} Na_{0.06} O₁₀ (OH_{0.98}F_{1.02}). Les cristaux de biotite ont subi un traitement aux ultrasons pour retirer les fines particules et enfin et une calibration en taille par tamisage pour ne conserver que les particules de 200 à 500 µm.

Tableau 5.2 : Design expérimental pour l'étude de l'interaction entre *Collimonas pratensis* PMB3(1) et la biotite au cours du temps

	Milieu (BHm)	Biotite	Bactéries		Nombre de répliquats et analyses			
					T = 0h	T = 20h	T = 44h	T = 68h
B	-Fe -Mg	-	-		1* AC	/	/	/
<u>BB</u>	-Fe -Mg	+	-		1* AC	1* AC	1* AC	1* AC
BC	+Fe +Mg	-	-		1* AC	/	/	/
BP	-Fe -Mg	-	+		/	4 TR+PR+AC	4 PR+AC	4 PR+AC
<u>BBP</u>	-Fe -Mg	+	+		/	4 TR+PR+AC	4 PR+AC	4 PR+AC
BCP	+Fe +Mg	-	+		/	4 TR+PR+AC	4 PR+AC	4 PR+AC

* Pour les échantillons non-inoculés, des triplicats techniques ont été réalisés

AC : analyses chimiques

TR : transcriptomique

PR : protéomique

B : BHm carencé en Fe et Mg (contrôle)

B : biotite

BB : BHm carencé en Fe et Mg avec Biotite (contrôle)

BC : BHm non carencé (contrôle)

BP : BHm carencé en Fe et Mg inoculé avec la souche PMB3(1)

BBP : BHm carencé en Fe et Mg avec Biotite inoculé avec la souche PMB3(1)

BCP : BHm complet inoculé avec la souche PMB3(1)

4.3. Mise en place de la cinétique d'altération

4.3.1. Préparation de l'inoculum bactérien

L'expérience présentée dans cette étude nécessite la préparation d'un inoculum bactérien de concentration calibrée. Pour réaliser cet inoculum, une préculture en milieu AB mannitol (ABm) solide (Chilton *et al.*, 1974) est nécessaire. Après 2 jours de culture à 25 °C, une colonie bactérienne est prélevée et inoculée dans 50 ml de milieu ABm liquide. Le milieu ABm est choisi pour la préculture car c'est un milieu pauvre mais qui permet de produire une quantité importante de biomasse bactérienne contrairement au milieu BHm. La culture est incubée à 25 °C sous agitation (150 rpm) pendant 2 jours. La culture est ensuite centrifugée à 8000 g, 15 min, 10 °C. Le culot bactérien est lavé 3 fois dans 10 ml d'eau mQ stérile (pas de solution saline car inadaptée aux impératifs expérimentaux) et est resuspendu dans de l'eau mQ stérile. La DO_(595 nm) est ensuite ajusté à 1.2 dans un erlenmeyer de 250 ml préalablement lavé à l'acide et stérile.

4.3.2. Design expérimental

Deux grammes de biotite ont été introduits dans des erlenmeyers de 150 ml préalablement lavés à l'acide (trois lavages à l'HCl 3 %). Les erlenmeyers ont ensuite été stérilisés par autoclavage (à sec). Quarante-cinq millilitres de milieu de culture BHm Complet (BC) (pH = 6.0 à T = 0h), ou BHm carencé en fer et magnésium (B) (pH = 6.2 à T = 0 h) ont été inoculés dans ces erlenmeyers stériles. A T = 0 h, 5 ml d'inoculum calibré nommé P (pour PMB3(1)) a été ajouté dans le milieu complet (BCP ; milieu BHm Complet + bactérie PMB3(1)), le milieu carencé (BP ; milieu BHm carencé + bactérie PMB3(1)) et le milieu carencé avec biotite (BBP ; milieu BHm carencé + Biotite + bactérie PMB3(1)) pour atteindre une concentration finale de 6.67×10^9 UFC/ml. Ces conditions ont été réalisées en quadruplats biologiques et ce pour chaque temps (T = 20, 44 et 68 h). Pour chaque temps, 4 erlenmeyers de chaque condition ont été sacrifiés pour réaliser les analyses chimiques et moléculaires. Des contrôles non-inoculés ont été réalisés en ajoutant 5 ml d'eau mQ stérile pour le milieu complet (BC), le milieu carencé (B) et le milieu carencé avec biotite (BB). Ces contrôles ont été analysés par triplicats techniques. Le contrôle BB a été analysé aux temps T = 0, 20, 44, 68 h pour évaluer la dissolution passive de la biotite au cours du temps. Tandis que les contrôles BC et B ont été analysés uniquement à T=0 h (Tableau 5.2).

Le design expérimental a été réalisé pour permettre une comparaison entre la condition de carence (BP) et la condition non-carencée (BCP) (*effet d'une carence en fer en magnésium*) ; entre la condition de carence BP et la condition avec biotite (BBP) (*effet de la présence d'un minéral*) et entre la condition non-carencée (BCP) et la condition avec biotite (BBP) (*effet de la disponibilité en nutriments inorganiques*). Pour observer l'effet des variations de milieu et du temps, des comparaisons ont été réalisées pour chaque temps (T = 20, 44, 68 h).

4.3.3. Conditionnement des échantillons

Pour les échantillons inoculés, un prélèvement de 10 ml de suspension a été réalisé et conservé dans la glace, afin de réaliser les dénombrements bactériens. Les échantillons ont été ensuite centrifugés à 7000 g pendant 30 min à 4 °C. Le surnageant a été réservé à 4 °C pour les analyses chimiques (§4.5). Le culot a été resuspendu dans 2 ml d'eau stérile RNase free. La suspension a été transvasée dans deux tubes eppendorfs préalablement pesés. Les cellules sont ensuite centrifugées une seconde fois à 7000 g, 30 min, 4 °C. Le surnageant a été éliminé et les tubes ont été pesés à nouveau pour déterminer la quantité de biomasse récoltée. Pour chaque échantillon, un tube a été plongé dans l'azote liquide et conservé à -80 °C pour les analyses de protéomiques, dans le cas du temps T = 20 h, le deuxième tube a directement été utilisé pour l'extraction d'ARN.

4.4. Dénombrement

Les suspensions bactériennes conservées dans la glace (quelques heures) ont été diluées par cascade de dilutions jusqu'à la dilution 10^{-8} . Des gouttes de 10 µl de chaque dilution ont ensuite été déposées sur milieu LBm solide. Après une incubation de 48 h à 25 °C, les colonies bactériennes ont été dénombrées considérant comme limite de goutte exploitable des valeurs de comptage comprises entre 3 et 30 colonies par goutte. La densité bactérienne a été évaluée en moyennant les différentes dilutions comptables.

4.5. Analyses chimiques sur le surnageant

Le surnageant conservé à 4 °C a été filtré à 0.22 µm (GHP Acrodisc 25 mm syringe filter ; PALL). Le pH a été mesuré au pH-mètre puis le surnageant a été congelé à -20 °C pour des

analyses complémentaires (mesures des acides organiques et des éléments chimiques en solution).

4.5.1. Mesure des acides organiques

La mesure des acides organiques présents a été réalisée sur la plateforme du LIEC (Laboratoire Interdisciplinaire des Environnements Continentaux, UMR7360) par chromatographie ionique avec détection conductimétrique (IGS 3000, Dionex Corp.) associée à une colonne analytique (IonPac® AS 11 HC, Dionex corp.) (Balland *et al.*, 2010) et par spectrométrie de masse. Les surnageants ont été élués dans des solutions de KOH de concentrations allant de 0.9 à 60 mM au cours du temps avec un débit de 1.3 ml/min. Des acides organiques synthétiques ont été utilisés comme références (formate de sodium, acide D-gluconique, butyrate de sodium, pyruvate de sodium, citrate de sodium tribasique, oxalate de sodium, propionate de sodium, acétate de sodium, acide succinique disodique, acide DL-malique disodique, L-lactate de sodium, acide malonique disodique).

4.5.2. Mesure des éléments chimiques (ICP)

Les éléments chimiques libérés à partir de la biotite (dont Fe, Mg, Al) dans le surnageant ou présents dans le milieu de culture ont été mesurés par spectrométrie à plasma à couplage inductif (700 Series ICP-OES, Agilent Technologies).

4.6. Analyses moléculaires

4.6.1. Extraction protéique et spectrométrie de masse

A partir des échantillons congelés à -80 °C, les culots bactériens ont été resuspendus dans un tampon de lithium dodecyl sulfate (1X ; 25 µl pour 1mg de culot) supplémenté de 200 mg de billes de silice (0.1 mm) (MP Biomedicals). Les cellules ont été lysées par action mécanique des billes (Precellys Evolution, Bertin Technologies) ; trois cycles de 7800 rpm pendant 20 s avec 30 s de pause entre chaque cycle ont été opérés. Les échantillons ont ensuite été centrifugés à 16 000 g pendant 1 min. Les surnageants obtenus ont été traités à 99 °C pendant 5 min puis un volume de 25 µl a été prélevé et chargé sur un gel NuPAGE 4 % - 12 % Bis-Tris pour une électrophorèse de 5 min à 200 V. Après migration, les protéines ont été colorées au bleu de Coomassie (Invitrogen). La protéolyse a été effectuée dans un gel de poly-acrylamide avec

0.2 µg de trypsine (Promega) supplémenté de 50 µl de 0.01 % de ProteaseMAX (Promega) comme décrit dans (E. M. Hartmann *et al.*, 2014). Après une incubation à 37 °C pendant 4 h, la solution a été acidifiée avec 5 % d'acide trifluoroacétique (TFA) et le volume a été ajusté à 50 µl avec du TFA 0.1 %. Un volume de 5 µl de cette suspension a été injecté en spectrométrie de masse en tandem (Q-Exactive HF, Thermo Scientific) couplé à un système ultimate 300 nanoLC (Thermo Scientific) dans les mêmes conditions décrites par (Hayoun *et al.*, 2019). Enfin, les protéines ont été resolubilisées dans une colonne à phase inverse (Acclaim PEPmap100 C18 ; 3 µm, 100 Å, 75 µm id × 50 cm) en gradient pendant 90 min. Le gradient a permis d'enregistrer environ 2.5 millions de spectre MS/MS dont 1.3 millions ont pu être attribués à PMB3(1). Un total de 33000 peptides a été identifié correspondant à 2447 protéines.

4.6.2. Extraction d'ARN

Les culots bactériens frais ont directement été resuspendus dans 1 ml de réactif TRI (solution monophasique contenant du phénol et de la guanidine thiocyanate ; RiboPure Kit) puis les instructions du kit (Ambion® RiboPure™, ThermoFisher Scientific) ont été suivies. Les ARN extraits ont ensuite subi un traitement à la DNase (kit Amibon® DNA-free™, Invitrogen 8174G). La concentration et la qualité des ARN ont été évaluées au Nanodrop 2000 (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA), Qubit® RNA Assay Kit, Qubit® 2.0 Fluorometer (Life Technologies, CA, USA) et par « Fragment Analyzer » (Agilent, Santa Clara, CA, USA). Lorsque cela a été nécessaire, certains échantillons ont été concentrés à l'aide du kit RNA Clean & Concentrator™ -5 (Zymo Research). Les ARN totaux ont été envoyés à GENEWIZ qui a effectué une ribodéplétion (Ribo-Zero rRNA removal kit) et la production d'ADNc. Le séquençage des ARNm a été effectué par Illumina HiSeq2500 en utilisant une configuration de 2x100 pb en haut débit (V4chemistry). Le séquençage a généré un total de 235 millions de séquences.

4.7. Traitement bioinformatique des données

Les séquences de RNAseq ont été cartographiées sur les séquences codantes (CDS) du génome de *Collimonas pratensis* PMB3(1) via la plateforme Microscope (Vallenet *et al.*, 2020) et l'outil BWA (version 0.7.4-r385 ; (Li and Durbin, 2009)). Le package DESeq2 (Anders and Huber, 2010; Love *et al.*, 2014) a été utilisé pour calculer l'abondance des gènes différentiellement exprimés (DEG) entre les différents traitements. Une normalisation du nombre de séquences

pour les réplicats dans chaque traitement a été effectuée (par des estimations de facteurs de taille dans DESeq2), puis des valeurs d'expression différentielle (FoldChange (FC)) et des valeurs statistiques (pVal et pVal ajustée par la procédure de Benjamini-Hochberg) évaluant le taux FDR (« false discovery rate ») ont été calculées. Tous les gènes ayant une P-value ajustée inférieure à 0.05 et une expression différentielle (log2FC) supérieure à 0.8 ont été considérés comme significativement différentiellement exprimés.

Pour les protéines, nous avons retenus 2447 protéines validées avec au moins 2 peptides pour tous les échantillons. Les données ont également été traitées avec DESeq2. Les protéines ayant une P-value ajustée inférieure à 0.05 et une expression différentielle (log2FC) supérieure à 0.5 ont été considérées comme significativement différentiellement produites (DPP).

De plus, les traitements ont été comparés en utilisant le package Mixomics sur le logiciel R (González *et al.*, 2012; Rohart *et al.*, 2017). Pour ce faire, les données sorties de l'analyse DEseq2 ont été utilisées pour identifier les gènes présents au minimum 50 fois pour au moins un traitement dans les données de transcriptomique et 5 fois pour les données de protéomique. Une régression des moindres carrés (PLS) a été réalisée permettant d'intégrer les données de transcriptomique et protéomique et ainsi générer une vue globale du jeu de données. Pour interpréter l'analyse, une régression des moindres carrés partiels clairsemés (sPLS) a ensuite été effectuée car elle permet une sélection de variables simultanées. La distribution des différents gènes considérés a ensuite été visualisée dans un cercle de corrélation permettant de mettre en évidence des gènes spécifiques pour chaque traitement.

4.8. Analyses statistiques

Les analyses statistiques ont été réalisées sur le logiciel R. Les données présentées dans cette étude sont des moyennes de réplicats indépendants. Les différences des moyennes des échantillons ont été analysées par une ANOVA à un facteur suivi d'un test TukeyHSD avec une P-value < 0.05.

5. Résultats préliminaires

Les résultats présentés ci-dessous ne sont que préliminaires car encore en cours d'analyse. J'ai choisi de présenter dans ce chapitre uniquement les données au temps 20 h car c'est à ce temps que sont disponibles le maximum de données de transcriptomique et protéomique.

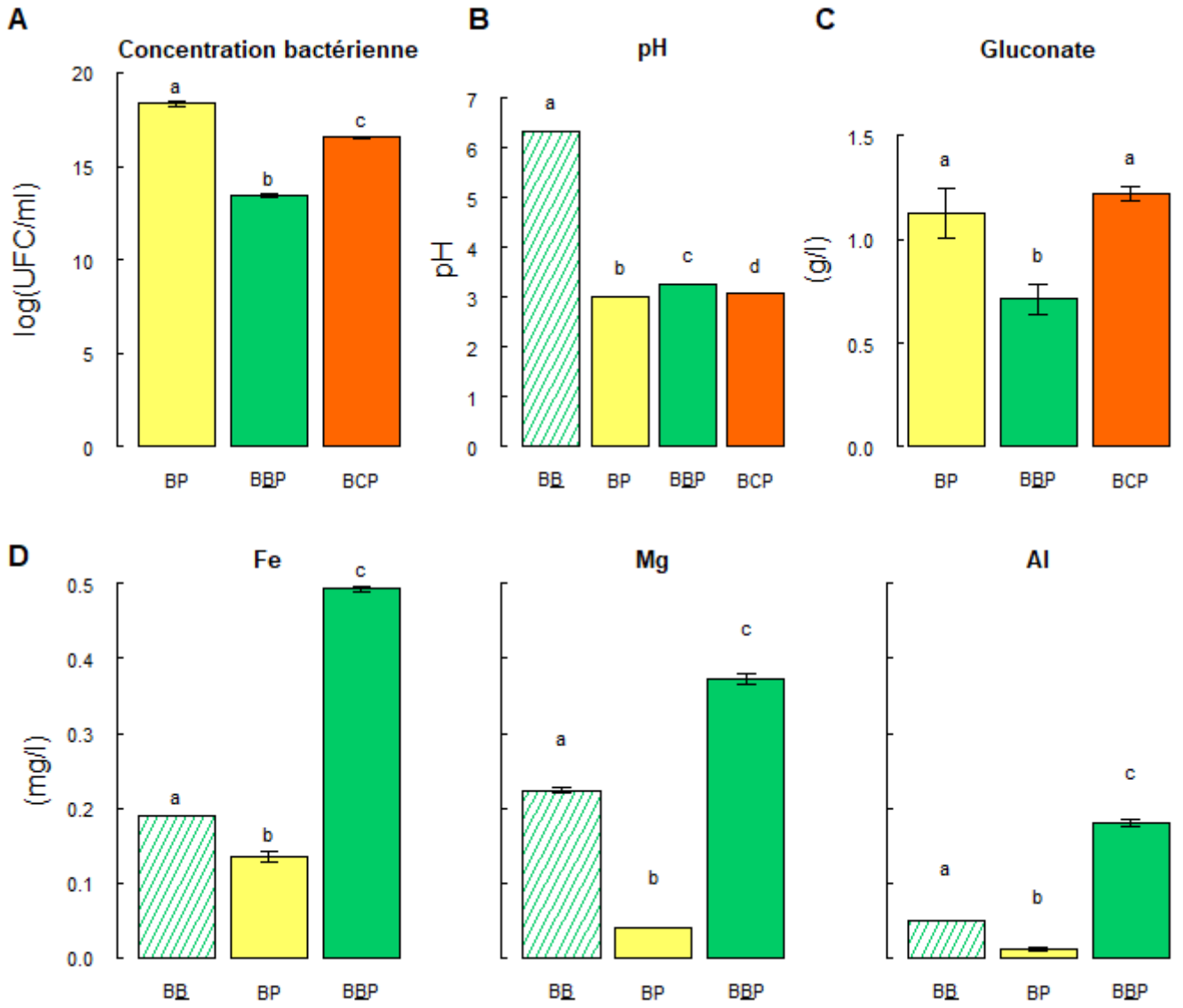


Figure 5.2 : Analyses chimiques et dénombrements

Cette figure représente la concentration bactérienne (A), le pH du milieu (B), la concentration en gluconate produit (C), et les éléments chimiques libérés à partir de la biotite (D) au bout de 20 h d'incubation. La barre hachurée est le contrôle du milieu de culture BHm avec biotite non-inoculé (BB). Les échantillons possédant la même lettre représentent les échantillons significativement indentiques ($P < 0.05$).

B : biotite

BP : BHm carencé en Fe et Mg inoculé avec la souche PMB3(1)

BBP : BHm carencé en Fe et Mg avec Biotite inoculé avec la souche PMB3(1)

BCP : BHm complet inoculé avec la souche PMB3(1)

5.1. Analyses chimiques

La mesure du pH pour chaque condition et à chaque temps a permis de démontrer que la souche modèle était capable d'acidifier le milieu dès les 20 premières heures (pH de 3.1 (BP), 3.3 (BBP) et 3.0 (BCP) pour un pH initial d'environ 6.2) (Figure 5.2B). Le pH à 20 h de la condition BBP a paru légèrement mais significativement moins acide comparé aux conditions BP et BCP.

La mesure des éléments chimiques présents dans la structure du minéral et absents de la composition du milieu (Fe, Mg, Al) permet d'évaluer la dissolution de la biotite dans les différentes conditions (Figure 5.2D). Le milieu carencé en présence de minéral non-inoculé (BB) a permis de suivre la dissolution passive du minéral. Après 20 h d'incubation, la biotite a relargué spontanément 0.19 mg/l de Fe, 0.22 mg/l de Mg et 0.05 mg/l d'Al. La condition BBP (milieu carencé avec biotite et bactéries) permet d'évaluer la capacité de la souche modèle à altérer la biotite. La souche PMB3(1) entraîne la libération de 0.49 mg/l de Fe, 0.37 mg/l de Mg et 0.18 mg/l d'Al à partir de la biotite ce qui correspond à un taux de dissolution de 0.027, 0.016 et 0.016 % pour Fe, Mg et Al respectivement si on ne considère pas ce qui est absorbé par les cellules. La concentration en éléments libérés (Fe, Mg et Al) est significativement plus importante en présence de bactéries (BBP) comparé au milieu non-inoculé (BB) indiquant une altération de la biotite active par la souche modèle PMB3(1).

5.2. Etat physiologique

Après 20 h d'incubation, la concentration bactérienne était de 9.3×10^7 , 6.9×10^5 et 1.5×10^7 UFC/ml pour les conditions BP, BBP et BCP. La quantité de cellules bactériennes en suspension est significativement différente en fonction du traitement, l'échantillon BBP (le seul avec biotite) présentant le moins de biomasse (Figure 5.2A). Une observation au microscope des particules de biotite après prélèvement de la solution a révélé qu'une partie des cellules est restée associée aux particules de biotite malgré des étapes d'agitation (biomasse non quantifiée). La biomasse présentée plus haut (6.9×10^5 UFC/ml) peut donc être faussée sur ce traitement.

Les acides organiques produits par la souche bactérienne en fonction des différents traitements ont été mesurés (Figure 5.2C). Parmi les acides organiques mesurés (acétate, butyrate, citrate, formate, fumarate, gluconate, lactate, malate, malonate, oxalate, propionate, pyruvate,

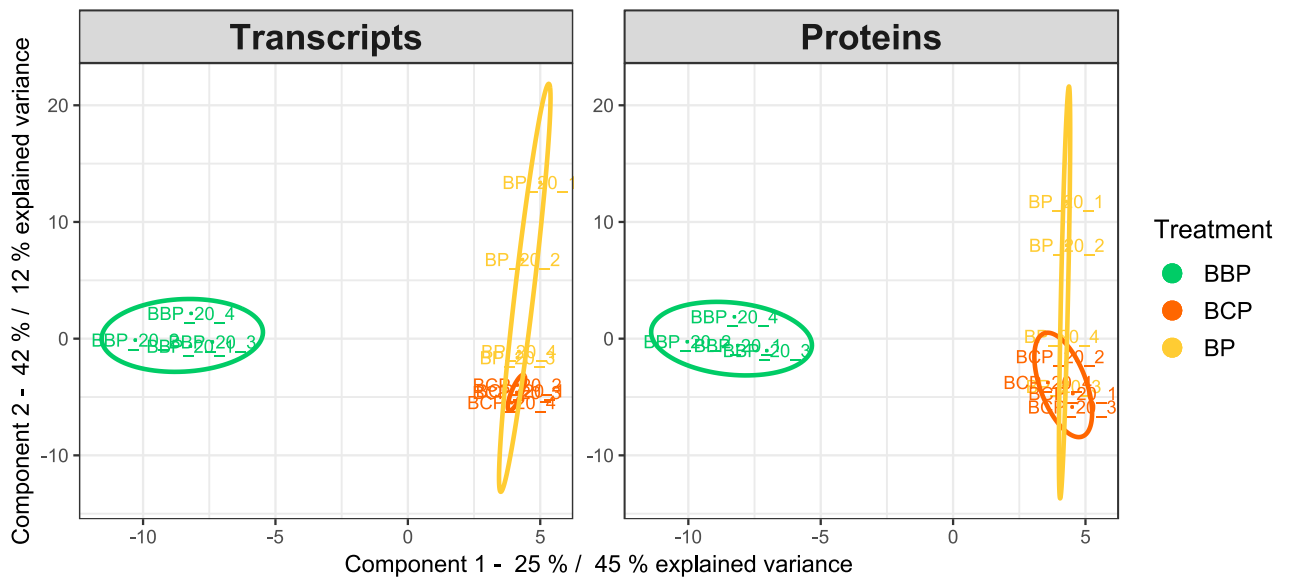
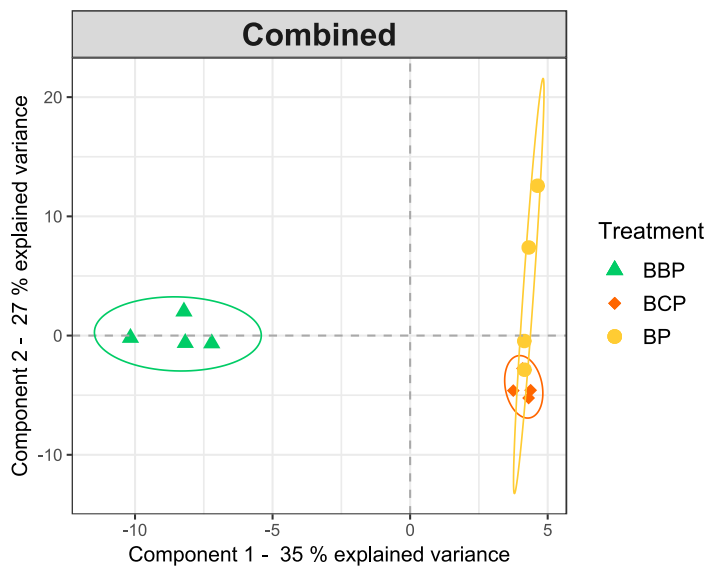
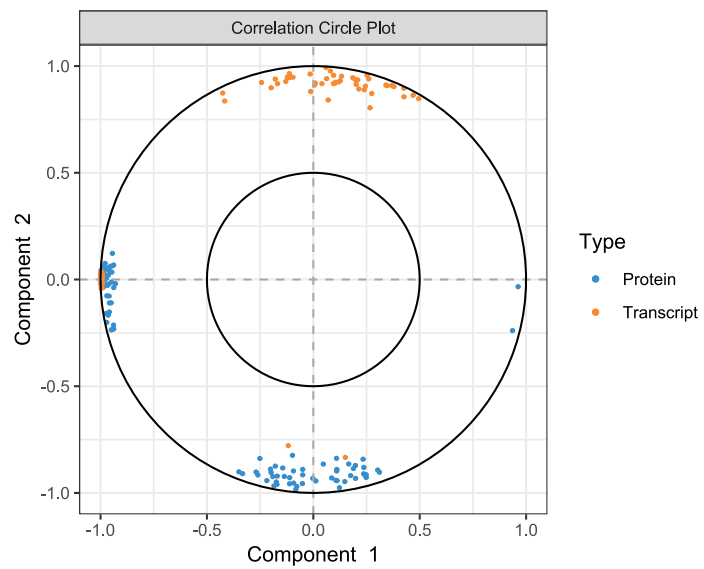
A**B****C**

Figure 5.3 : Régression PLS (Partial Least Squares) des données de transcriptomique et protéomique

Les données de transcriptomiques et protéomiques ont été pris en compte *via* une régression PLS pour visualiser une distribution des données de transcriptomique, protéomique (A) ou les deux combinées (B) ainsi que le cercle de corrélation correspondant (C).

Les traitements BBP, BCP et BP correspondent au vert, rouge et jaune respectivement.

succinate, tartarate), seul le gluconate a été détecté. A 20 h, la quantité de gluconate produit par la souche modèle était de 1.1, 0.7, 1.2 g/l respectivement pour les traitements BP, BBP et BCP. La souche PMB3(1) produit significativement moins de gluconate dans le traitement BBP comparativement aux autres traitements BP et BCP.

5.3. Analyses moléculaires

5.3.1. Statistiques des résultats

En ce qui concerne les résultats de transcriptomique, le nombre total de séquences obtenues pour tous les échantillons était de 235 millions. Le nombre de séquences pour un échantillon variait entre 16 et 23 millions correspondant à un total de 35 Gb de séquences pairées de 150 pb. Entre 78.5 % et 95.8 % de séquences ont été cartographiées au moins une fois sur le génome de *C. pratensis* PMB3(1). Un nettoyage du jeu de données a été réalisé en éliminant les séquences non-cartographiées et celles correspondant aux ARNr et ARNt pour se concentrer sur les ARNm.

L'analyse DESeq2 a révélé qu'un total de 3298, 187 et 3149 gènes sont différentiellement exprimés en considérant respectivement les comparaisons BBP vs BP, BCP vs BP et BBP vs BCP (pour une P-value ajustée < 0.05 et un nombre de séquences dans au moins un des traitements ≥ 50) ce qui correspond à 60.0, 3.4 et 57.3 % du total de gènes de PMB3(1). En appliquant un seuil de ≤ 0.8 et ≥ -0.8 (\log_2FC), la quantité de gènes différentiellement exprimés atteint 2522, 123 et 2410 gènes respectivement pour les comparaisons BBP vs BP, BCP vs BP et BBP vs BCP correspondant à 45.9, 2.2 et 43.9 % du total de gène de PMB3(1).

En ce qui concerne l'analyse protéomique, l'analyse DESeq2 a révélé que 124, 20 et 195 protéines sont différentiellement produites en considérant respectivement les comparaisons BBP vs BP, BCP vs BP et BBP vs BCP (pour une P-value ajustée < 0.05 et un nombre de séquences dans au moins un des traitements ≥ 5). En appliquant un seuil entre -0.5 et 0.5 (\log_2FC), la quantité de protéines différentiellement produites retenues dans cette étude est respectivement de 122, 20 et 166 pour les comparaisons BBP vs BP, BCP vs BP et BBP vs BCP.

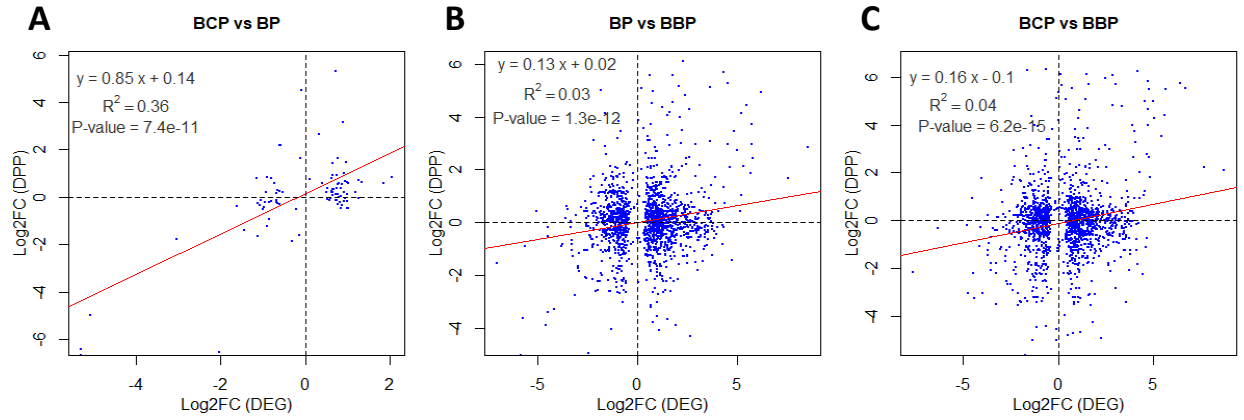


Figure 5.4 : Corrélation entre les gènes différentiellement exprimés (DEG) et les protéines différentiellement produites (DPP) à T = 20 h

Ce graphique représente en abscisse le log₂FC des DEG et en ordonné le log₂FC des DPP pour la comparaison BP vs BCP (A), BP vs BBP (B) et BCP vs BBP (C). Une régression linéaire a été tracée en rouge et son équation, l'indice de corrélation et la P-value associée sont indiqués en haut à gauche du graphique.

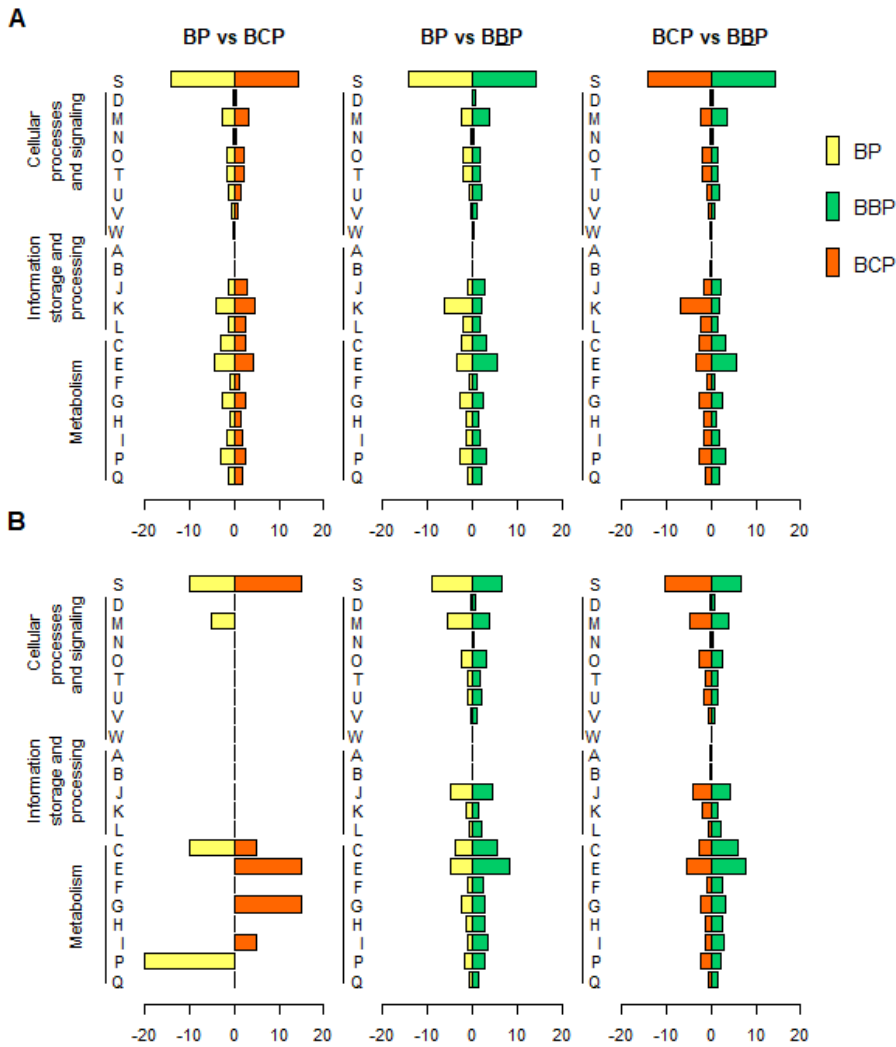


Figure 5.5 : Proportions des gènes différentiellement exprimés et protéines différentiellement produites classées par catégories COG

La proportion des gènes différentiellement exprimés (A) ou des protéines différentiellement produites (B) pour une catégorie COG (%) ont été représentés par comparaison (BP vs BCP ; BP vs BBP ; BBP vs BCP).

- | | |
|----------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------|
| A : RNA processing and modification | L : Replication, recombination and repair |
| B : Chromatin structure and dynamics | M : Cell wall/membrane/envelope biogenesis |
| C : Energy production and conversion | N : Cell motility |
| D : Cell cycle control, cell division, chromosome partitioning | O : Posttranslational modification, protein turnover, chaperones |
| E : Amino acid transport and metabolism | P : Inorganic ion transport and metabolism |
| F : Nucleotide transport and metabolism | Q : Secondary metabolites biosynthesis, transport and catabolism |
| G : Carbohydrate transport and metabolism | S : Function unknown |
| H : Coenzyme transport and metabolism | T : Signal transduction mechanisms |
| I : Lipid transport and metabolism | U : Intracellular trafficking, secretion, and vesicular transport |
| J : Translation, ribosomal structure and biogenesis | V : Defense mechanisms |
| K : Transcription | W : Extracellular structures |

5.3.2. Approche sans *a priori*

5.3.2.1. Analyses multivariées combinant les approches de transcriptomique et protéomique

Pour une vision d'ensemble des données, une régression PLS (Partial Least Squares) a été réalisée *via* Mixomics (Figure 5.3). Cette méthode utilise les données brutes de séquençage et est basée sur les données retenues après filtrage (§4.7). MixOmics permet de combiner des approches différentes, ici protéomique et transcriptomique. Cette méthode indique que le traitement BBP se sépare des autres traitements sans minéral (BP et BCP) sur l'axe 1 qui explique 35 % de la variance tandis que les échantillons BP et BCP restent très proches et ont plutôt tendance à se séparer sur l'axe 2 qui représente 27 % de la variance.

D'après ces résultats, les données de transcriptomique et protéomique concordent, permettant une séparation des traitements. Néanmoins, si on considère les gènes différentiellement régulés (DEG) et/ou produits (DPP) selon nos critères, il n'y a pas de corrélation entre les log₂FC des DEG et DPP pour les trois comparaisons considérées (Figure 5.4) En effet, les indices de corrélation (R^2) sont respectivement de 36 ; 3 et 4 % pour les comparaisons BCP *vs* BP, BP *vs* BBP et BCP *vs* BBP.

5.3.2.2. Les clusters de groupes orthologues (COG)

Les gènes différentiellement exprimés (DEG) et les protéines différentiellement produites (DPP) ont été distribués dans des clusters de groupes orthologues (COG) pour chaque comparaison (Figure 5.6).

Effet de la carence en Fe et Mg (BP vs BCP)

La comparaison BP *vs* BCP a été réalisée pour étudier l'effet de carence sur la régulation des gènes. Notamment les DEG/DPP liés au transport des acides aminés (E) ($BP_{ARN} = 4.3\%$ *vs* $BCP_{ARN} = 4.4\%$; $BP_{Prot} = 0\%$ *vs* $BCP_{Prot} = 15\%$), des carbohydrates aminés (G) ($BP_{ARN} = 2.6\%$ *vs* $BCP_{ARN} = 2.7\%$; $BP_{Prot} = 0\%$ *vs* $BCP_{Prot} = 15\%$) et des lipides (I) ($BP_{ARN} = 1.4\%$ *vs* $BCP_{ARN} = 1.8\%$; $BP_{Prot} = 0\%$ *vs* $BCP_{Prot} = 15\%$) sont surexprimés dans le milieu complet (BCP), comparés au milieu carencé (BP).

A l'inverse, une plus grande représentation de DEG/DPP associés à la production et la conversion de l'énergie (C) a été observée dans le milieu complet (BCP) ($BP_{ARN} = 3.0\%$ *vs* $BCP_{ARN} = 2.6\%$; $BP_{Prot} = 10\%$ *vs* $BCP_{Prot} = 5\%$).

Tableau 5.3 : Top 20 des gènes différentiellement exprimés en transcriptomique en prenant en compte la comparaison**BP vs BCP**

Ce tableau présente les 20 premiers gènes différentiellement exprimés dont le log2FC était le plus important pour la condition BP (BP > BCP) ou BCP (BCP > BP). Les critères utilisés étaient un log2FC > 0.8, une P-value ajustée (padj) < 0.05 et un nombre minimal de séquences de 50. Les données présentées en gras correspondent à la technique considérée par le Top20 (transcriptomique). En parallèle les données de protéomiques sont présentées à titre informatif. Les ronds de couleur indiquent certains clusters de gènes intéressants et retrouvés dans d'autres top20 pour d'autres comparaisons (BP/BBP/BCP) et/ou techniques (transcriptomique/protéomique).

n.d. : non-déTECTÉ par la méthode

n.s.: P-value ajustée > 0.05

Gris : log2FC en dehors du seuil fixé

Label	Name	Product	Transcriptomic		Proteomic	
			log2FC	padj	log2FC	padj
BP > BCP						
● COLLI_v1_240057	-	Heavy metal efflux pump, CzcA family protein and Cation efflux system protein CusA	-5.31	1.6E-57	-6.67	6.0E-07
● COLLI_v1_240056	-	Efflux transporter, outer membrane factor (OMF) lipo, NodT family protein n.d. Cation efflux system protein CusC	-5.31	1.3E-111	-6.42	1.2E-06
● COLLI_v1_240058	<i>zneB</i>	Membrane fusion protein n.d. Cation efflux system protein CzcB	-5.10	2.7E-44	-4.98	1.7E-07
COLLI_v1_180099	-	conserved protein of unknown function	-3.04	6.6E-22	-1.77	6.3E-07
COLLI_v1_540050	-	conserved protein of unknown function	-2.24	1.1E-13	n.d.	n.d.
● COLLI_v1_170054	<i>mgtA</i>	Mg(2(+)) importing P-type ATPase	-2.04	7.9E-09	-6.55	6.3E-07
● COLLI_v1_540052	-	Ferric siderophore transport system, periplasmic binding protein TonB	-1.94	6.1E-11	n.d.	n.d.
● COLLI_v1_540051	-	Bacterioferritin-associated ferredoxin	-1.82	5.9E-05	n.d.	n.d.
COLLI_v1_170244	-	Vault inter-alpha-trypsin domain protein	-1.62	7.9E-06	-0.36	n.s.
COLLI_v1_200212	-	Putative membrane protein	-1.61	1.8E-07	n.d.	n.d.
COLLI_v1_240028	-	conserved protein of unknown function	-1.55	7.0E-04	n.d.	n.d.
COLLI_v1_180098	-	D-amino acid dehydrogenase small subunit	-1.45	2.6E-05	-1.38	n.s.
COLLI_v1_130043	-	conserved protein of unknown function	-1.40	1.6E-02	n.d.	n.d.
● COLLI_v1_540053	<i>exbB</i>	Biopolymer transport protein ExbB	-1.40	2.8E-08	n.d.	n.d.
COLLI_v1_370049	-	protein of unknown function	-1.31	1.5E-02	n.d.	n.d.
COLLI_v1_470009	-	Short chain dehydrogenase family protein	-1.27	3.6E-03	n.d.	n.d.
COLLI_v1_200338	-	SnoaL-like polyketide cyclase family protein	-1.26	3.6E-05	n.d.	n.d.
COLLI_v1_470008	-	Zinc-binding dehydrogenase family protein	-1.25	3.2E-02	n.d.	n.d.
COLLI_v1_90003	<i>dctA</i>	C4 dicarboxylate/orotate:H(+) symporter	-1.22	1.9E-04	n.d.	n.d.
COLLI_v1_240055	-	conserved protein of unknown function	-1.18	5.3E-03	n.d.	n.d.
BCP > BP						
COLLI_v1_90008	-	Histidine kinase-, DNA gyrase B-, and HSP90-like ATPase family protein	2.06	2.0E-15	0.82	n.s.
COLLI_v1_370033	-	Glycine zipper family protein	1.93	6.1E-09	n.d.	n.d.
COLLI_v1_410029	-	conserved protein of unknown function	1.93	7.7E-05	n.d.	n.d.
COLLI_v1_380059	-	conserved exported protein of unknown function	1.92	6.8E-08	n.d.	n.d.
COLLI_v1_190129	-	Acytransferase family protein	1.87	3.0E-10	n.d.	n.d.
COLLI_v1_90007	-	conserved exported protein of unknown function	1.86	9.5E-12	0.59	n.s.
COLLI_v1_90009	-	conserved exported protein of unknown function	1.70	6.4E-05	n.d.	n.d.
COLLI_v1_410028	-	MarR family protein	1.61	6.9E-12	n.d.	n.d.
COLLI_v1_200275	-	protein of unknown function	1.49	3.8E-02	n.d.	n.d.
COLLI_v1_90010	-	conserved exported protein of unknown function	1.34	1.4E-02	0.63	n.s.
COLLI_v1_20237	<i>aroG</i>	3-deoxy-7-phosphoheptulonate synthase, Phe-sensitive	1.27	9.4E-06	-0.04	n.s.
COLLI_v1_670010	-	Efflux transporter, outer membrane factor (OMF) lipo, NodT family protein	1.27	3.1E-05	0.72	n.s.
COLLI_v1_350021	-	conserved exported protein of unknown function	1.22	4.6E-03	n.d.	n.d.
COLLI_v1_460045	-	Major Facilitator Superfamily protein	1.22	4.7E-02	n.d.	n.d.
COLLI_v1_180083	-	Outer membrane component of tripartite multidrug resistance system	1.21	4.8E-04	n.d.	n.d.
COLLI_v1_200276	-	conserved protein of unknown function	1.21	1.1E-02	n.d.	n.d.
COLLI_v1_680017	-	Permeases of the major facilitator superfamily	1.20	1.8E-04	n.d.	n.d.
COLLI_v1_180092	<i>hmp</i>	Flavohepmprotein	1.19	1.4E-02	n.d.	n.d.
COLLI_v1_240031	<i>leuA</i>	2-isopropylmalate synthase	1.19	4.2E-07	0.21	n.s.
COLLI_v1_140014	-	Major Facilitator Superfamily protein	1.17	5.4E-04	n.d.	n.d.

Effet de la présence du minéral (BP vs BBP)

Lorsque l'on considère l'effet de la présence du minéral sur la régulation des gènes, tous les DEG et DPP sont surexprimés en présence du minéral (BBP). Les DEG/DPP liés au catabolisme, transport et biosynthèse de métabolites secondaires (Q) ($BP_{ARN} = 1.1 \%$ vs $\underline{BBP}_{ARN} = 1.9 \%$; $BP_{Prot} = 0.8 \%$ vs $\underline{BBP}_{Prot} = 1.2 \%$), au transport d'ions inorganiques (P) ($BP_{ARN} = 2.7 \%$ vs $\underline{BBP}_{ARN} = 3.0 \%$; $BP_{Prot} = 1.6 \%$ vs $\underline{BBP}_{Prot} = 2.6 \%$), de lipides (I) ($BP_{ARN} = 1.5 \%$ vs $\underline{BBP}_{ARN} = 1.8 \%$; $BP_{Prot} = 1.0 \%$ vs $\underline{BBP}_{Prot} = 3.3 \%$), d'acides aminés (E) ($BP_{ARN} = 3.4 \%$ vs $\underline{BBP}_{ARN} = 5.4 \%$; $BP_{Prot} = 4.7 \%$ vs $\underline{BBP}_{Prot} = 8.4 \%$), à la production et conversion de l'énergie (C) ($BP_{ARN} = 2.6 \%$ vs $\underline{BBP}_{ARN} = 3.0 \%$; $BP_{Prot} = 3.8 \%$ vs $\underline{BBP}_{Prot} = 5.6 \%$), à la sécrétion et au transport vésiculaire (U) ($BP_{ARN} = 0.8 \%$ vs $\underline{BBP}_{ARN} = 1.8 \%$; $BP_{Prot} = 1.2 \%$ vs $\underline{BBP}_{Prot} = 1.9 \%$) ainsi qu'aux mécanismes de défense (V) ($BP_{ARN} = 0.5 \%$ vs $\underline{BBP}_{ARN} = 1.0 \%$; $BP_{Prot} = 0.4 \%$ vs $\underline{BBP}_{Prot} = 1 \%$) sont surexprimés en présence du minéral (BBP).

Effet de la disponibilité en Fe et Mg (BBP vs BCP)

L'effet de la disponibilité en nutriments inorganiques sur la régulation des gènes a été évalué par la comparaison du milieu pauvre en présence de minéral (BBP) avec le milieu complet (BCP). Les DEG/DPP impliqués dans la synthèse membranaire (M) ($\underline{BBP}_{ARN} = 3.5 \%$ vs $BCP_{ARN} = 2.5 \%$; $\underline{BBP}_{Prot} = 3.9 \%$ vs $BCP_{Prot} = 4.9 \%$), la sécrétion et le transport vésiculaires (U) ($\underline{BBP}_{ARN} = 1.8 \%$ vs $BCP_{ARN} = 0.9 \%$; $\underline{BBP}_{Prot} = 1.6 \%$ vs $BCP_{Prot} = 1.5 \%$), la production et la conversion d'énergie (C) ($\underline{BBP}_{ARN} = 3.1 \%$ vs $BCP_{ARN} = 2.5 \%$; $\underline{BBP}_{Prot} = 6.1 \%$ vs $BCP_{Prot} = 2.8 \%$), le transport d'acides aminés (E) ($\underline{BBP}_{ARN} = 5.6 \%$ vs $BCP_{ARN} = 3.3 \%$; $\underline{BBP}_{Prot} = 7.5 \%$ vs $BCP_{Prot} = 5.5 \%$), de lipides (I) ($\underline{BBP}_{ARN} = 1.8 \%$ vs $BCP_{ARN} = 1.5 \%$; $\underline{BBP}_{Prot} = 2.9 \%$ vs $BCP_{Prot} = 1.1 \%$), d'ions inorganiques (P) ($\underline{BBP}_{ARN} = 3.2 \%$ vs $BCP_{ARN} = 2.5 \%$; $\underline{BBP}_{Prot} = 2.0 \%$ vs $BCP_{Prot} = 2.3 \%$) et le catabolisme, transport et biosynthèse de métabolites secondaires (Q) ($\underline{BBP}_{ARN} = 1.8 \%$ vs $BCP_{ARN} = 1.1 \%$; $\underline{BBP}_{Prot} = 1.3 \%$ vs $BCP_{Prot} = 0.6 \%$) sont surexprimés en présence du minéral (BBP) par rapport à la condition du milieu complet (BCP).

5.3.2.3. Analyse détaillée des gènes différentiellement exprimés et des protéines différentiellement produites

Un premier aperçu des DEG et DPP pour chaque comparaison est présenté dans les tableaux 5.3 à 5.8.

Tableau 5.4 : Top 20 des protéines différentiellement produites en protéomique en prenant en compte la comparaison**BP vs BCP**

Ce tableau présente les protéines différentiellement produites dont le log₂FC était le plus important pour la condition BP (BP > BCP) ou BCP (BCP > BP). Etant donné le faible nombre de DPP pour cette comparaison, moins de 20 protéines ont pu être présentées pour chaque condition. Les critères utilisés étaient un log₂FC > 0.5, une P-value ajustée (padj) < 0.05 et un nombre minimal de séquences de 5. Les données présentées en gras correspondent à la technique considérée par le Top20 (protéomique). En parallèle les données de transcriptomique sont présentées à titre informatif. Les ronds de couleur indiquent certains clusters de gènes intéressants et retrouvés dans d'autres top20 pour d'autres comparaisons (BP/BBP/BCP) et/ou techniques (transcriptomique/protéomique).

n.d. : non-déteecté par la méthode

n.s.: P-value ajustée > 0.05

Gris : log₂FC en dehors du seuil fixé

Label	Name	Product	Transcriptomic		Proteomic	
			log ₂ FC	padj	log ₂ FC	padj
BP > BCP						
● COLLI_v1_240057	-	Heavy metal efflux pump, CzcA family protein and Cation efflux system protein CusA	-5.31	1.6E-57	-6.67	6.0E-07
● COLLI_v1_170054	<i>mgtA</i>	Mg(2(+)) importing P-type ATPase	-2.04	7.9E-09	-6.55	6.3E-07
● COLLI_v1_240056	-	Efflux transporter, outer membrane factor (OMF) lipo, NodT family protein / Cation efflux system protein CusC	-5.31	1.3E-111	-6.42	1.2E-06
● COLLI_v1_240058	<i>zneB</i>	Membrane fusion protein / Cation efflux system protein CzcB	-5.10	2.7E-44	-4.98	1.7E-07
COLLI_v1_10033	<i>glcD</i>	glycolate dehydrogenase, putative FAD-linked subunit	-0.32	n.s.	-1.84	2.6E-02
COLLI_v1_180099	-	conserved protein of unknown function	-3.04	6.6E-22	-1.77	6.3E-07
COLLI_v1_180048	<i>lldD</i>	L-lactate dehydrogenase	-0.14	n.s.	-1.61	5.5E-05
COLLI_v1_70075	-	Phasin family domain protein	-0.86	n.s.	-0.95	6.3E-07
COLLI_v1_170203	<i>katG</i>	hydroperoxidase I	-0.21	n.s.	-0.53	3.2E-02
BCP > BP						
● COLLI_v1_630019	<i>gcl</i>	glyoxylate carboligase	0.04	n.s.	6.16	2.2E-06
COLLI_v1_420042	-	Formate dehydrogenase	0.73	1.4E-02	5.32	3.1E-04
● COLLI_v1_630017	<i>glxR</i>	tartronate semialdehyde reductase 2	-0.09	n.s.	4.49	8.0E-03
● COLLI_v1_630018	<i>hyi</i>	hydroxypyruvate isomerase	-0.10	n.s.	4.49	8.4E-03
COLLI_v1_130038	-	Urea ABC transporter, urea binding protein	0.90	3.5E-02	3.18	1.4E-02
● COLLI_v1_200138	-	Periplasmic binding s and sugar binding domain of LacI family protein	0.33	n.s.	2.65	8.0E-03
COLLI_v1_290017	-	Phosphate starvation-inducible protein PsiF	-0.58	n.s.	2.19	2.0E-02
COLLI_v1_190133	-	SPFH domain / Band 7 family protein	0.78	4.4E-03	1.66	2.0E-02
COLLI_v1_30017	-	Thimet oligopeptidase	-0.11	n.s.	1.62	3.2E-02
COLLI_v1_350016	-	Zinc carboxypeptidase family protein	0.11	n.s.	0.75	3.2E-02
COLLI_v1_260052	-	Glucose/mannose transport system substrate-binding protein	0.41	n.s.	0.60	5.4E-03

Effet de la carence en Fe et Mg (BP vs BCP)

Pour étudier l'effet de carence sur la régulation des gènes de la souche PMB3(1), la comparaison entre les traitements BP vs BCP a été réalisée. Les 20 DEG dont le log₂FC est le plus élevé sont présentés dans le Tableau 5.3. Dans la **condition BP (milieu carencé)**, on notera dans les 20 gènes les plus différentiellement exprimés plusieurs gènes impliqués dans le transport d'ions comme le cluster de gènes codant pour un système d'efflux de cations (COLLI_v1_240056/ COLLI_v1_240057/ COLLI_v1_240058), le gène *mgtA* codant une ATPase qui permettrait l'import de Mg²⁺ (COLLI_v1_170054), un gène codant un système de symport de protons (H⁺) et de C4-dicarboxylate/orotate (COLLI_v1_90003) et un cluster de gènes codant pour un système de transport et d'acquisition du fer (COLLI_v1_540051/ COLLI_v1_540052/ COLLI_v1_540053). Enfin, 3 gènes codant pour des déshydrogénases semblent surexprimés en condition de carence (BP) tels que le gène codant une acide D-amine déshydrogénase (COLLI_v1_180098) et deux gènes qui codent pour une déshydrogénase fixant le zinc (COLLI_v1_470007/ COLLI_v1_470008).

Dans la condition en **milieu complet (BCP)**, les gènes surexprimés sont des gènes impliqués dans la synthèse d'acides aminés ou dans le métabolisme du pyruvate comme les gènes *leuA* (COLLI_v1_240031) et *aroG* (COLLI_v1_20237), des gènes codant pour des protéines de la famille des MFS (Major Facilitator Superfamily protein) responsables du transport de solutés (COLLI_v1_460045/ COLLI_v1_140014/COLLI_v1_680017), un gène impliqué dans un système d'efflux (COLLI_670010) et un gène codant pour une protéine de la grande famille des systèmes d'efflux (NodT) (COLLI_v1_180083).

En ce qui concerne l'analyse protéomique (Tableau 5.4), dans la **condition de carence (BP)**, 4 protéines de transport d'ions sont surproduites qui sont aussi retrouvées en transcriptomique (COLLI_v1_240056/COLLI_v1_240057/COLLI_v1_240058/COLLI_v1_170054). Certaines enzymes dont une glycolate déshydrogénase (COLLI_v1_10033) et une L-lactate déshydrogénase (COLLI_v1_180048) et enfin une hydroperoxydase I (COLLI_V1_170203) sont également surproduites.

Dans le **milieu complet (BCP)**, ce sont des enzymes liées au métabolisme du glyoxylate et des dicarboxylates qui sont surproduites comme le cluster de gènes (COLLI_v1_630017/ COLLI_v1_630018/COLLI_v1_630019). De plus, des protéines liées au transport de glucose/mannose (COLLI_v1_260052), à la fixation/reconnaissance de sucres (COLLI_v1_200138), ainsi qu'une protéine de transport d'urée (COLLI_v1_130038) sont surproduites en condition du milieu complet (BCP).

Tableau 5.5 : Top 20 des gènes différentiellement exprimés en transcriptomique en prenant en compte la comparaison BP vs BBP

Ce tableau présente les 20 premiers gènes différentiellement exprimés dont le log2FC était le plus important pour la condition BP (BP > BBP) ou BBP (BBP > BP). Les critères utilisés étaient un log2FC > 0.8, une P-value ajustée (padj) < 0.05 et un nombre minimal de séquences de 50. Les données présentées en gras correspondent à la technique considérée par le Top20 (transcriptomique). En parallèle les données de protéomiques sont présentées à titre informatif. Les ronds de couleur indiquent certains clusters de gènes intéressants et retrouvés dans d'autres top20 pour d'autres comparaisons (BP/BBP/BCP) et/ou techniques (transcriptomique/protéomique).

n.d. : non-déTECTÉ par la méthode

n.s.: P-value ajustée > 0.05

Gris : log2FC en dehors du seuil fixé

Label	Name	Product	Transcriptomic		Proteomic	
			log2FC	padj	log2FC	padj
BP > BBP						
			-7.03	9.5E-166	-1.54	n.s.
●	COLLI_v1_280092	- 47 kDa protein	-6.10	7.6E-100	n.d.	n.d.
	COLLI_v1_130043	- conserved protein of unknown function	-5.98	3.4E-42	n.d.	n.d.
●	COLLI_v1_200233	- Cytochrome C oxidase subunit II, periplasmic domain protein	-5.84	1.0E-44	-5.02	5.7E-04
●	COLLI_v1_190054	- F420_oxidored domain-containing protein	-5.72	2.9E-82	n.d.	n.d.
●	COLLI_v1_200232	- Tat (Twin-arginine translocation) Ser/Thr protein phosphatase family protein	-5.72	8.9E-52	-3.61	6.5E-07
●	COLLI_v1_280091	- ABC transporter family protein	-5.71	5.6E-30	n.d.	n.d.
●	COLLI_v1_190055	<i>ykvO</i> Uncharacterized oxidoreductase YkvO	-5.65	1.0E-71	-0.91	n.s.
●	COLLI_v1_200231	- RNA polymerase sigma factor	-5.34	8.3E-40	n.d.	n.d.
●	COLLI_v1_190053	- Transcriptional regulator family protein	-5.33	9.5E-123	n.d.	n.d.
	COLLI_v1_130042	<i>dapA</i> 4-hydroxy-tetrahydrodipicolinate synthase	-5.26	1.3E-158	n.d.	n.d.
	COLLI_v1_130041	- conserved protein of unknown function	-5.18	9.0E-150	n.d.	n.d.
●	COLLI_v1_280090	- Zinc ABC transporter, inner membrane permease protein ZnuB	-5.05	1.2E-37	n.d.	n.d.
●	COLLI_v1_200230	- Zinc-finger family protein	-5.03	2.6E-44	0.41	n.s.
	COLLI_v1_140006	- Periplasmic binding domain protein	-4.94	1.6E-112	n.d.	n.d.
	COLLI_v1_10143	- Aminotransferase class-V family protein	-4.79	2.7E-34	n.d.	n.d.
	COLLI_v1_290018	- protein of unknown function	-4.68	3.9E-10	n.d.	n.d.
	COLLI_v1_240062	- Bacterial regulatory s, tetR family protein	-4.67	1.0E-42	n.d.	n.d.
	COLLI_v1_420029	- conserved protein of unknown function	-4.56	1.5E-45	-3.88	4.0E-02
	COLLI_v1_430018	<i>map</i> methionine aminopeptidase	-4.50	4.4E-64	-0.19	n.s.
BBP > BP						
●	COLLI_v1_720003	- autotransporter adhesin protein	8.59	0.0E+00	2.87	n.s.
●	COLLI_v1_220007	- Fimbrial family protein	8.30	3.7E-157	n.d.	n.d.
●	COLLI_v1_720004	- autotransporter adhesin protein	7.60	1.2E-185	1.69	n.s.
●	COLLI_v1_200038	- Methyltransferase domain protein	6.20	7.2E-105	4.94	4.7E-04
	COLLI_v1_130038	- Urea ABC transporter, urea binding protein	5.82	1.7E-114	2.42	n.s.
	COLLI_v1_1310002	- protein of unknown function	5.77	4.9E-28	n.d.	n.d.
●	COLLI_v1_200039	- Taurine catabolism dioxygenase TauD, TfdA family protein	5.76	1.9E-108	2.96	n.s.
●	COLLI_v1_200045	<i>rhbA</i> Diaminobutyrate--2-oxoglutarate aminotransferase	5.76	7.2E-86	3.72	n.s.
●	COLLI_v1_200040	- ABC transporter family protein	5.69	1.4E-106	1.88	n.s.
●	COLLI_v1_200044	- Fatty acid desaturase family protein	5.56	5.2E-149	n.d.	n.d.
●	COLLI_v1_720002	<i>xadA</i> autotransporter adhesin protein	5.49	1.8E-104	n.d.	n.d.
●	COLLI_v1_200036	- Acyl-CoA dehydrogenase, C-terminal domain protein	5.47	1.1E-133	4.46	4.6E-03
●	COLLI_v1_200037	- Citrate synthase family protein	5.34	1.2E-82	2.12	n.s.
	COLLI_v1_680053	- MltA-interacting MipA family protein	5.32	2.5E-66	n.d.	n.d.
●	COLLI_v1_200043	- FAD linked oxidase, C-terminal domain protein	5.24	1.0E-49	1.02	n.s.
●	COLLI_v1_220006	<i>lpfB</i> putative fimbrial chaperone LpfB	5.23	6.5E-46	n.d.	n.d.
●	COLLI_v1_200035	- 3-Oxoacyl-[acyl-carrier-(ACP)] synthase III C terminal family protein	5.21	1.7E-107	4.12	1.3E-02
●	COLLI_v1_200041	- ABC-2 type transporter family protein	5.20	9.5E-57	0.41	n.s.
	COLLI_v1_690053	- conserved exported protein of unknown function	5.14	4.3E-50	n.d.	n.d.
●	COLLI_v1_200046	- Alpha-ketoglutaric semialdehyde dehydrogenase 2	5.01	1.6E-74	2.72	2.0E-02

Effet de la présence du minéral (BP vs BBP)

Pour étudier l'effet de la présence du minéral sur la régulation des gènes de la souche PMB3(1), la comparaison entre les traitements BP vs BBP a été réalisée. Les 20 DEG dont le log₂FC est le plus élevé sont présentés dans le Tableau 5.5. Les gènes surexprimés en **condition de carence (BP)** sont des gènes impliqués dans des réactions d'oxydoréduction comme le cluster de gènes COLLI_v1_200233 et COLLI_v1_200230 qui codent pour une cytochrome c oxidase et une protéine contenant du zinc respectivement ainsi que le cluster de gènes codant pour un régulateur transcriptionnel (COLLI_v1_190053), une protéine contenant un domaine d'oxydoréduction (COLLI_v1_190054) et une oxydoréductase (COLLI_v1_190055). Un cluster de gènes est également surexprimé en condition de carence et est responsable de la synthèse de protéines de transport ABC (COLLI_v1_280090/COLLI_v1_280091/COLLI_v1_280092). On peut également noter un gène codant pour une phosphatase dépendante du système de transport TAT (Twin Arginine Transport system) (voir CHAPITRE 2) (COLLI_v1_200232) potentiellement régulé par le facteur sigma (COLLI_v1_200231).

Lorsque l'on considère les gènes surexprimés en **présence du minéral (BBP)**, plusieurs gènes impliqués dans l'adhésion ont été détectés notamment des gènes codant un autotransporteur d'adhésine et des transporteurs d'adhésines (respectivement, COLLI_v1_720002/COLLI_v1_720003/COLLI_v1_720004) et des fimbriae (COLLI_v1_220006/COLLI_v1_220007). De manière intéressante, une suite de 11 gènes impliqués dans la synthèse d'acides gras ont été détectés (COLLI_v1_200035/COLLI_v1_200036/COLLI_v1_200037/COLLI_v1_200038/COLLI_v1_200039/COLLI_v1_200040/COLLI_v1_200041/COLLI_v1_200043/COLLI_v1_200044/COLLI_v1_200045/COLLI_v1_200046). Enfin, un gène de transport d'urée (COLLI_v1_130038) est surexprimé en présence du minéral.

En ce qui concerne l'analyse protéomique (Tableau 5.6), seules 20 protéines ont été identifiées comme différenciellement produites, le classement en « Top 20 » comprend donc moins de 20 DPP par condition. Les DPP en **condition de carence (BP)**, sont une phosphatase dépendante du système TAT identifiée également en transcriptomique (COLLI_v1_200232) qui est suivie d'une cytochrome c oxidase (COLLI_v1_200233). Une protéine liée à la fixation d'oligonucléotides ou oligosaccharides (famille OB-fold) (COLLI_v1_70014) ainsi qu'une protéine de transport de sucres (*i.e.*, glycosyltransférase ; COLLI_v1_140053) sont surproduites en carence (BP). Une protéine liée aux signaux de transduction telle que l'adénylate cyclase (COLLI_v1_190114) a été détectée.

Tableau 5.6 : Top 20 des protéines différentiellement produites en protéomique en prenant en compte la comparaison**BBP vs BP**

Ce tableau présente les 20 premières protéines différentiellement produites dont le log2FC était le plus important pour la condition BP (BP > BBP) ou BBP (BBP > BP). Les critères utilisés étaient un log2FC > 0.5, une P-value ajustée (padj) < 0.05 et un nombre minimal de séquences de 5. Les données présentées en gras correspondent à la technique considérée par le Top20 (protéomique). En parallèle les données de transcriptomique sont présentées à titre informatif. Les ronds de couleur indiquent certains clusters de gènes intéressants et retrouvés dans d'autres top20 pour d'autres comparaisons (BP/BBP/BCP) et/ou techniques (transcriptomique/protéomique).

n.d. : non-détecté par la méthode

n.s.: P-value ajustée > 0.05

Gris : log2FC en dehors du seuil fixé

Label	Name	Product	Transcriptomic		Proteomic	
			log2FC	padj	log2FC	padj
BP > BBP						
● COLLI_v1_200233	-	Cytochrome C oxidase subunit II, periplasmic domain protein	-5.84	1.0E-44	-5.02	5.7E-04
COLLI_v1_70014	-	Bacterial OB fold family protein	1.54	6.6E-13	-3.67	2.2E-02
● COLLI_v1_200232	-	Tat (Twin-arginine translocation) Ser/Thr protein phosphatase family protein	-5.72	8.9E-52	-3.61	6.5E-07
COLLI_v1_400083	-	conserved exported protein of unknown function	-4.45	1.5E-37	-3.38	2.8E-07
COLLI_v1_170244	-	Vault inter-alpha-trypsin domain protein	-4.18	2.8E-43	-3.26	1.9E-05
COLLI_v1_140053	-	Glycosyltransferase, WecB/TagA/CpsF family protein	0.70	8.7E-03	-3.19	1.3E-03
COLLI_v1_10067	-	AhpC/TSA family protein	-0.96	1.2E-02	-2.65	1.8E-03
COLLI_v1_110046	-	Putative lipoprotein	-1.95	2.1E-05	-2.58	2.9E-04
COLLI_v1_70081	-	D-alanyl-D-alanine carboxypeptidase family protein	0.05	n.s.	-2.25	3.5E-02
COLLI_v1_190114	-	Adenylate cyclase	-1.15	1.4E-05	-2.10	2.2E-02
COLLI_v1_540058	-	Histone H1-like nucleoHC2 family protein	1.03	5.7E-03	-2.05	1.1E-05
COLLI_v1_540068	-	SWIB/MDM2 domain protein	1.25	1.9E-03	-2.02	2.8E-07
COLLI_v1_200303	-	Putative histone H1-like HC2	1.18	7.1E-09	-1.98	1.4E-07
COLLI_v1_460136	-	conserved exported protein of unknown function	-1.78	3.2E-06	-1.98	2.4E-06
COLLI_v1_140044	-	Capsule polysaccharide export protein	0.71	1.7E-02	-1.83	4.5E-03
COLLI_v1_490011	<i>rpmC</i>	50S ribosomal subunit protein L29	3.03	5.7E-39	-1.79	9.5E-04
COLLI_v1_140040	-	conserved exported protein of unknown function	1.18	1.7E-05	-1.67	4.5E-03
COLLI_v1_130104	-	conserved exported protein of unknown function	0.63	2.4E-02	-1.58	4.1E-02
COLLI_v1_400032	-	conserved exported protein of unknown function	-0.27	n.s.	-1.57	3.1E-02
COLLI_v1_490014	<i>rplX</i>	50S ribosomal subunit protein L24	2.52	2.5E-15	-1.52	1.2E-04
BBP > BP						
COLLI_v1_170079	<i>nemA</i>	N-ethylmaleimide reductase	0.10	n.s.	6.49	2.2E-07
COLLI_v1_470013	-	conserved protein of unknown function	2.29	4.3E-10	6.11	1.4E-06
● COLLI_v1_420058	-	2OG-Fe(II) oxygenase superfamily protein	4.34	7.6E-43	5.68	1.9E-05
COLLI_v1_440098	-	protein of unknown function	1.81	1.3E-17	5.59	2.5E-05
COLLI_v1_580001	-	protein of unknown function	0.62	1.2E-03	5.59	2.5E-05
● COLLI_v1_420060	-	tRNA synthetases class I family protein	4.57	6.5E-112	5.26	1.4E-04
COLLI_v1_200026	-	collimomycin ?	2.09	7.4E-12	5.17	1.9E-04
● COLLI_v1_420056	-	Pyridine nucleotide-disulfide oxidoreductase family protein	3.69	7.9E-51	5.14	2.2E-04
COLLI_v1_570064	-	protein of unknown function	0.24	n.s.	5.09	2.9E-04
COLLI_v1_260034	<i>rhE</i>	ATP-dependent RNA helicase RhE	-1.79	1.4E-13	5.02	1.9E-04
COLLI_v1_490148	-	VgrG protein	0.77	1.5E-03	4.99	4.0E-04
● COLLI_v1_200038	-	Methyltransferase domain protein	6.20	7.2E-105	4.94	4.7E-04
COLLI_v1_10008	<i>thiC</i>	phosphomethylpyrimidine synthase	2.42	7.6E-31	4.80	4.4E-04
COLLI_v1_230001	-	protein of unknown function	1.65	2.1E-10	4.16	5.6E-03
COLLI_v1_220058	-	putative D-alanine--poly(phosphoribitol) ligase	2.14	5.2E-18	3.97	3.5E-04
COLLI_v1_460111	<i>lipA</i>	lipoyl synthase	0.05	n.s.	3.89	4.9E-03
COLLI_v1_500016	-	Dynamain family protein	0.32	n.s.	3.58	2.3E-03
COLLI_v1_200153	<i>ispG</i>	4-hydroxy-3-methylbut-2-en-1-yl diphosphate synthase (flavodoxin)	0.56	n.s.	3.28	1.8E-03
COLLI_v1_220026	-	Glu/Leu/Phe/Val dehydrogenase family protein	0.65	2.7E-03	3.13	1.5E-02
COLLI_v1_10092	-	Signal transduction histidine kinase CheA	3.69	1.2E-48	3.08	1.9E-08

Pour les protéines surproduites en **présence du minéral (BBP)**, on peut noter des protéines liées aux systèmes d'oxydoréduction comme la N-éthylmaleimide réductase (COLLI_170079), une oxydoréductase (COLLI_v1_420056), une oxygénase (COLLI_v1_420058) et une flavodoxine (COLLI_v1_200153). Des enzymes liées au métabolisme d'acides aminés ont été détectées comme une phosphométhylpyrimidine synthase (COLLI_v1_10008), une ligase (COLLI_v1_220058) et une déshydrogénase (COLLI_v1_220026).

Effet de la disponibilité en Fe et Mg (BBP vs BCP)

Pour étudier l'effet de la disponibilité en nutriments inorganiques sur la régulation des gènes par la souche PMB3(1), la comparaison entre la condition complet (BCP) et la condition en présence de minéral (BBP) a été réalisée. Les 20 gènes les plus différenciellement régulés dans chaque condition sont présentés dans le Tableau 5.7. En ce qui concerne les gènes surexprimés dans la **condition BBP**, on retrouve les mêmes gènes codant des protéines d'adhésion comme l'autotransporteur d'adhésine et les adhésines (COLLI_v1_720002/COLLI_v1_720003/COLLI_v1_720004) ou les fimbriae (COLLI_v1_220005/COLLI_v1_220006/COLLI_v1_220007). Certains gènes de transport d'ions ont été détectés comme le cluster de 3 gènes dont une ATPase responsable de l'import de Mg^{2+} (COLLI_v1_170052/COLLI_v1_170053/COLLI_v1_170054) et un cluster de gènes liés à l'efflux de cations (COLLI_v1_240056/COLLI_v1_240057/COLLI_v1_240058). Enfin, on retrouve quelques gènes du cluster responsables de la synthèse d'acides gras (COLLI_v1_200036/COLLI_v1_200038/COLLI_v1_200039/ COLLI_v1_200045).

Dans le **milieu complet (BCP)**, parmi les gènes surexprimés certains sont en lien avec les mécanismes d'oxydoréduction comme l'oxydoréductase YkvO (COLLI_v1_190053/COLLI_v1_190054/COLLI_v1_190055) ou une cytochrome c oxidase (COLLI_v1_200233). Des gènes codant un système de transport de zinc ont été détectés dont une perméase (COLLI_v1_280090/COLLI_v1_280091/COLLI_v1_280092). Des gènes impliqués dans le métabolisme ont été identifiés dont une 4-hydroxy-tétrahydrodipicolinate synthase (COLLI_v1_130042). Enfin, on retrouve la phosphatase dépendante du système TAT (COLLI_v1_200232).

En ce qui concerne les données de protéomique (Tableau 5.8), les protéines surproduites en **présence du minéral (BBP)** sont des protéines liées à l'efflux de cations (COLLI_v1_240056/COLLI_v1_240057) qui ont aussi été retrouvées en transcriptomique tout comme l'ATPase d'import de Mg^{2+} (COLLI_v1_170054). On retrouve également deux protéines liées à la

Tableau 5.7 : Top 20 des gènes différentiellement exprimés en transcriptomique en prenant en compte la comparaison **BBP vs BCP**

Ce tableau présente les 20 premiers gènes différentiellement exprimés dont le log2FC était le plus important pour la condition **BBP** (**BBP** > **BCP**) ou **BCP** (**BCP** > **BBP**). Les critères utilisés étaient un log2FC > 0.8, une P-value ajustée (padj) < 0.05 et un nombre minimal de séquences de 50. Les données présentées en gras correspondent à la technique considérée par le Top20 (transcriptomique). En parallèle les données de protéomiques sont présentées à titre informatif. Les ronds de couleur indiquent certains clusters de gènes intéressants et retrouvés dans d'autres top20 pour d'autres comparaisons (BP/**BBP**/BCP) et/ou techniques (transcriptomique/protéomique).

n.d. : non-déecté par la méthode

n.s.: P-value ajustée > 0.05

Gris : log2FC en dehors du seuil fixé

Label	Name	Product	Transcriptomic		Proteomic	
			log2FC	padj	log2FC	padj
BBP > BCP						
● COLLI_v1_720003	-	autotransporter adhesin protein	8.75	0.0E+00	2.09	n.s.
COLLI_v1_1310002	-	protein of unknown function	7.85	5.4E-22	n.d.	n.d.
● COLLI_v1_170052	-	conserved protein of unknown function	7.72	5.9E-26	n.d.	n.d.
● COLLI_v1_720004	-	autotransporter adhesin protein	7.70	3.4E-168	2.22	n.s.
● COLLI_v1_220007	-	Fimbrial family protein	7.30	7.2E-129	n.d.	n.d.
● COLLI_v1_170053	-	conserved protein of unknown function	7.02	1.2E-48	n.d.	n.d.
● COLLI_v1_240056	-	Efflux transporter, outer membrane factor (OMF) lipo, NodT family protein / Cation efflux system protein CusC	6.71	3.6E-191	5.53	9.5E-05
● COLLI_v1_170054	<i>mgtA</i>	Mg(2(+)) importing P-type ATPase	6.42	4.8E-166	5.75	3.2E-05
● COLLI_v1_240057	-	Heavy metal efflux pump, CzcA family protein and Cation efflux system protein CusA	6.33	9.8E-82	7.07	1.2E-08
● COLLI_v1_720002	<i>xadA</i>	autotransporter adhesin protein	5.94	4.5E-92	n.d.	n.d.
● COLLI_v1_200038	-	Methyltransferase domain protein	5.65	3.7E-79	5.47	1.1E-04
● COLLI_v1_240058	<i>zneB</i>	Membrane fusion protein / Cation efflux system protein CzcB	5.60	5.9E-58	4.40	4.1E-06
● COLLI_v1_220005	<i>lpfC</i>	Outer membrane usher protein LpfC	5.56	1.2E-87	n.d.	n.d.
COLLI_v1_680053	-	MltA-interacting MipA family protein	5.48	5.2E-71	n.d.	n.d.
COLLI_v1_440092	-	Putative membrane protein	5.45	8.0E-59	n.d.	n.d.
● COLLI_v1_200039	-	Taurine catabolism dioxygenase TauD, TfdA family protein	5.44	2.5E-95	3.50	n.s.
● COLLI_v1_220006	<i>lpfB</i>	putative fimbrial chaperone LpfB	5.12	6.6E-46	n.d.	n.d.
● COLLI_v1_200045	<i>rhbA</i>	Diaminobutyrate--2-oxoglutarate aminotransferase	5.07	8.9E-130	4.25	1.8E-02
● COLLI_v1_200036	-	Acyl-CoA dehydrogenase, C-terminal domain protein	5.03	5.5E-70	5.00	1.3E-03
COLLI_v1_690053	-	conserved exported protein of unknown function	4.99	2.8E-43	n.d.	n.d.
BCP > BBP						
COLLI_v1_20287	-	saccharopine dehydrogenase NADP-binding domain-containing protein	-7.65	8.6E-258	-2.16	5.8E-03
● COLLI_v1_190054	-	F420_oxidored domain-containing protein	-6.70	4.7E-84	n.d.	n.d.
● COLLI_v1_190055	<i>ykvO</i>	Uncharacterized oxidoreductase YkvO	-6.35	4.3E-107	-0.32	n.s.
● COLLI_v1_190053	-	Transcriptional regulator family protein	-5.84	5.6E-49	n.d.	n.d.
● COLLI_v1_280092	-	47 kDa protein	-5.68	3.3E-124	n.d.	n.d.
● COLLI_v1_280091	-	ABC transporter family protein	-5.41	3.6E-52	n.d.	n.d.
● COLLI_v1_280090	-	Zinc ABC transporter, inner membrane permease protein ZnuB	-5.17	1.9E-27	n.d.	n.d.
COLLI_v1_130041	-	conserved protein of unknown function	-5.06	8.2E-153	n.d.	n.d.
COLLI_v1_140006	-	Periplasmic binding domain protein	-5.03	8.1E-61	n.d.	n.d.
COLLI_v1_130042	<i>dapA</i>	4-hydroxy-tetrahydrodipicolinate synthase	-5.02	1.3E-149	n.d.	n.d.
COLLI_v1_430018	<i>map</i>	methionine aminopeptidase	-4.82	1.0E-63	-0.19	n.s.
COLLI_v1_170086	-	protein of unknown function	-4.79	1.5E-57	n.d.	n.d.
● COLLI_v1_200233	-	Cytochrome C oxidase subunit II, periplasmic domain protein	-4.75	5.1E-49	-3.03	n.s.
COLLI_v1_560133	-	Bacterial regulatory s, tetR family protein	-4.68	9.5E-76	n.d.	n.d.
● COLLI_v1_200231	-	RNA polymerase sigma factor	-4.64	1.5E-41	n.d.	n.d.
COLLI_v1_430016	-	conserved protein of unknown function	-4.59	4.9E-46	n.d.	n.d.
COLLI_v1_550078	-	D-galactonate regulator, IclR family	-4.58	4.0E-79	n.d.	n.d.
● COLLI_v1_200230	-	Zinc-finger family protein	-4.51	1.5E-49	0.95	n.s.
COLLI_v1_10143	-	Aminotransferase class-V family protein	-4.50	4.7E-78	-2.21	n.s.
● COLLI_v1_200232	-	Tat (Twin-arginine translocation) Ser/Thr protein phosphatase family protein	-4.42	3.5E-50	-3.22	4.1E-05

synthèse d'acides gras membranaires identifiées en transcriptomique (COLLI_v1_200033/COLLI_v1_200038). Une N-éthylmaléimide réductase (COLLI_v1_170079) liée à la dégradation de composés toxiques est surproduite. Une phosphométhylpyrimidine synthase (COLLI_v1_10008) est également surproduite.

Dans le **milieu complet (BCP)**, parmi le top 20 des protéines surproduites, certaines sont liées au métabolisme comme la formate déshydrogénase (COLLI_v1_420042) ou le cluster de gènes (COLLI_v1_630017/COLLI_v1_630018/ COLLI_v1_630019) qui codent respectivement pour une tartronate semialdéhyde réductase, une hydroxypyruvate isomérase et une glyoxylate carboligase. Certaines protéines surproduites sont liées au transport d'ions comme une ATPase transportant du K^+ (COLLI_v1_260297) ou une protéine liée au trafic du Fe^{2+} (COLLI_v1_100028). On retrouve également la phosphatase dépendante du système TAT qui est surproduite (COLLI_v1_200232).

5.3.3. Approche avec *a priori*

Dans les chapitres précédents, j'ai pu démontrer l'implication de différents gènes liés à la capacité à altérer les minéraux de la souche PMB3(1) : (i) la GMC oxydoréductase qui acidifie le milieu et altère les minéraux par acidolyse, (ii) le sidérophore qui agit par chélation des ions et altère les minéraux par complexolyse. J'ai donc préférentiellement suivi l'expression des gènes liés à ces fonctions dans les données de transcriptomique et protéomique en y ajoutant des gènes liés au transport et/ou à la gestion des produits dérivés. En d'autres termes, je me suis concentrée sur certains gènes cibles liés (i) au métabolisme du glucose et du gluconate ou (ii) aux systèmes d'acquisition du fer.

L'analyse protéomique à 20 h a révélé que la plupart des protéines d'intérêt n'a pas été détectée (n.d.) ou leur régulation entre les différents traitements n'était pas significative (n.s.) (Tableaux 5.9 et 5.10). Pour cette raison, les données présentées ci-dessous ne traiteront que des gènes cibles différentiellement exprimés obtenus par l'approche de transcriptomique (les données de protéomiques sont tout de même mis en vis-à-vis).

Tableau 5.8 : Top 20 des protéines différentiellement produites en protéomique en prenant en compte la comparaison**BBP vs BCP**

Ce tableau présente les 20 premières protéines différentiellement produites dont le log2FC était le plus important pour la condition BBP (BBP > BCP) ou BCP (BCP > BBP). Les critères utilisés étaient un log2FC > 0.5, une P-value ajustée (padj) < 0.05 et un nombre minimal de séquences de 5. Les données présentées en gras correspondent à la technique considérée par le Top20 (protéomique). En parallèle les données de transcriptomique sont présentées à titre informatif. Les ronds de couleur indiquent certains clusters de gènes intéressants et retrouvés dans d'autres top20 pour d'autres comparaisons (BP/BBP/BCP) et/ou techniques (transcriptomique/protéomique).

n.d. : non-déTECTÉ par la méthode

n.s.: P-value ajustée > 0.05

Gris : log2FC en dehors du seuil fixé

Label	Name	Product	Transcriptomic		Proteomic	
			log2FC	padj	log2FC	padj
BBP > BCP						
● COLLI_v1_240057	-	Heavy metal efflux pump, CzcA family protein and Cation efflux system protein CusA	6.33	9.8E-82	7.07	1.2E-08
COLLI_v1_170079	<i>nemA</i>	N-ethylmaleimide reductase	-0.66	1.8E-03	6.30	6.7E-07
COLLI_v1_260034	<i>rhIE</i>	ATP-dependent RNA helicase RhIE	-1.62	1.0E-07	6.28	2.0E-06
● COLLI_v1_420058	-	2OG-Fe(II) oxygenase superfamily protein	4.16	5.2E-60	6.21	2.8E-06
COLLI_v1_440098	-	protein of unknown function	1.52	3.7E-08	6.12	4.1E-06
COLLI_v1_580001	-	protein of unknown function	0.11	n.s.	6.12	4.1E-06
COLLI_v1_10008	<i>thiC</i>	phosphomethylpyrimidine synthase	2.88	2.9E-46	6.06	5.4E-06
COLLI_v1_470013	-	conserved protein of unknown function	2.47	1.1E-29	5.92	4.5E-06
COLLI_v1_420060	-	tRNA synthetases class I family protein	4.75	6.8E-69	5.80	2.6E-05
● COLLI_v1_170054	<i>mgTA</i>	Mg(2+) importing P-type ATPase	6.42	4.8E-166	5.75	3.2E-05
COLLI_v1_200026	-	collimomycin ?	1.62	7.9E-13	5.71	4.1E-05
● COLLI_v1_420056	-	Pyridine nucleotide-disulfide oxidoreductase family protein	3.05	2.2E-45	5.67	4.6E-05
COLLI_v1_570064	-	protein of unknown function	0.18	n.s.	5.63	6.1E-05
● COLLI_v1_240056	-	Efflux transporter, outer membrane factor (OMF) lipo, NodT family protein / Cation efflux system protein CusC	6.71	3.6E-191	5.53	9.5E-05
COLLI_v1_490148	-	VgrG protein	0.71	2.6E-02	5.52	9.7E-05
● COLLI_v1_200033	-	Diaminopimelate decarboxylase	4.76	2.6E-44	5.47	1.1E-04
● COLLI_v1_200038	-	Methyltransferase domain protein	5.65	3.7E-79	5.47	1.1E-04
COLLI_v1_500016	-	Dynamamin family protein	0.00	n.s.	5.37	7.3E-05
COLLI_v1_20086	<i>dnaE</i>	DNA polymerase III subunit alpha	-0.11	n.s.	5.12	6.4E-04
COLLI_v1_200336	-	Rhs element Vgr family protein	1.43	1.7E-12	5.08	1.0E-03
BCP > BBP						
COLLI_v1_420042	-	Formate dehydrogenase	-1.76	1.9E-11	5.61	4.1E-05
● COLLI_v1_630019	<i>gcl</i>	glyoxylate carboligase	-0.07	n.s.	5.01	1.1E-04
COLLI_v1_90010	-	conserved exported protein of unknown function	-1.36	5.7E-05	4.97	7.2E-04
COLLI_v1_40004	-	Putative lipoprotein	2.29	2.4E-13	4.92	3.6E-04
● COLLI_v1_630018	<i>hyi</i>	hydroxypyruvate isomerase	0.50	2.4E-02	4.78	7.0E-04
● COLLI_v1_290019	-	conserved exported protein of unknown function	0.76	3.9E-04	4.68	2.9E-03
COLLI_v1_70014	-	Bacterial OB fold family protein	1.19	7.7E-08	4.66	4.6E-04
COLLI_v1_270032	<i>rpmG</i>	50S ribosomal subunit protein L33	-0.07	n.s.	4.54	1.7E-03
COLLI_v1_100028	<i>ygX</i>	putative Fe(2+)-trafficking protein	0.34	n.s.	3.95	1.4E-02
COLLI_v1_190006	-	conserved exported protein of unknown function	-3.29	2.6E-17	3.48	5.1E-03
● COLLI_v1_630017	<i>glxR</i>	tartronate semialdehyde reductase 2	0.82	4.8E-05	3.47	5.1E-03
● COLLI_v1_290017	-	Phosphate starvation-inducible protein PsiF	0.82	1.2E-02	3.39	2.4E-04
COLLI_v1_200309	-	conserved exported protein of unknown function	-0.88	7.5E-06	3.37	4.2E-02
COLLI_v1_260297	<i>kdpB</i>	K(+) transporting P-type ATPase subunit KdpB	-2.00	2.4E-12	3.37	4.3E-02
COLLI_v1_10067	-	AhpC/TSA family protein	-1.60	3.4E-07	3.37	1.0E-05
● COLLI_v1_200232	-	Tat (Twin-arginine translocation) Ser/Thr protein phosphatase family protein	-4.42	3.5E-50	3.22	4.1E-05
COLLI_v1_400083	-	conserved exported protein of unknown function	-3.98	1.4E-52	3.03	1.1E-05
COLLI_v1_110046	-	Putative lipoprotein	-2.14	5.2E-10	3.03	2.1E-06
COLLI_v1_170244	-	Vault inter-alpha-trypsin domain protein	-2.39	8.4E-12	2.88	6.1E-04
COLLI_v1_240012	-	CVNH domain protein	-0.36	n.s.	2.85	4.7E-04

5.3.3.1. Le métabolisme du glucose

Effet de la carence en Fe et Mg (BP vs BCP)

En ce qui concerne l'effet de la carence (BP vs BCP), le seul gène régulé est le gène *gdhS* codant pour la petite sous-unité de la GMC oxydoréductase (décrite dans le CHAPITRE 2) (COLLI_v1_380041) qui est surexprimé en condition de carence (BP) (Tableau 5.9).

Effet de la présence du minéral (BP vs BBP)

En considérant l'effet du minéral (BP vs BBP), les gènes surexprimés en présence du minéral sont deux glucose-6-phosphate déshydrogénases (*zwf*) (COLLI_v1_260043/COLLI_v1_260051) et une glucose-6-phosphate isomérase. En revanche, les gènes surexprimés en absence du minéral sont les gènes codant une glucose-6-phosphate déshydrogénase (*zwf*) (COLLI_v1_200088), une 6-phosphogluconate déshydrogénase (COLLI_v1_200373), une gluconate kinase (COLLI_v1_260346), un transporteur de 2-ketogluconate (COLLI_v1_180157), une gluconokinase (COLLI_v1_180157), une glyoxylate réductase (COLLI_v1_180156) et les gènes de synthèse du système de transport TAT (*tatABC*) (COLLI_v1_490126/ COLLI_v1_490127/COLLI_v1_490128).

Effet de la disponibilité en Fe et Mg (BBP vs BCP)

En comparant le milieu complet (BCP) avec le milieu carencé en présence de minéral (BBP), les gènes surexprimés en présence du minéral (BBP) sont les gènes codant les deux sous-unités *gdhS* et *gdhL* de la GMC oxydoréductase (COLLI_v1_380041/COLLI_v1_380042), un gène *zwf* codant une glucose-6-phosphate déshydrogénase (COLLI_v1_260043) et les gènes *eda* et *edd* codant respectivement une aldolase et une phosphogluconate déhydratase (COLLI_v1_260040/COLLI_v1_260041) et enfin un gène *pgi* codant une glucose phosphate isomérase (COLLI_v1_260042). A l'inverse, les gènes surexprimés en absence du minéral (BCP) sont deux gènes de synthèse et maturation de cytochrome c (COLLI_v1_490037/COLLI_v1_490038), les gènes de synthèse du système TAT (*tatA* et *tatB* respectivement COLLI_v1_490126/ COLLI_v1_490127), un gène *zwf* codant une glucose-6-phosphate déshydrogénase (COLLI_v1_200088), une gluconate kinase (COLLI_v1_260346), une alcool déshydrogénase (COLLI_v1_37000), un gène responsable du transport du 2-ketogluconate (COLLI_v1_180157) et un gène codant une gluconokinase (COLLI_v1_180158) et une glyoxylateréductase (COLLI_v1_180156).

Tableau 5.9 : Analyse avec *a priori* se focalisant sur l'expression de gènes liés au métabolisme du glucose pour chaque condition (BP vs BCP, BP vs BBP, BCP vs BBP)

Les chiffres présentés indiquent le nombre de séquences obtenues pour chaque gène d'intérêt pour chaque comparaison *via* l'analyse Deseq2 (valeur normalisée). Le nombre de séquence pour un même échantillon peut donc être différent mais reste dans un même ordre de grandeur. Les lettres n.d. représentent les gènes qui n'ont pas été détectés dans les conditions testées. Les lettres n.s. indiquent que le niveau d'expression du gène considéré est significativement identique entre les deux traitements testés (P-value ajustée < 0.05). Les chiffres écrits en blanc indiquent que le log2FoldChange est en dehors du seuil utilisé pour l'approche de transcriptomique sans *a priori* -0.8/0.8. Les chiffres soulignés sont ceux dont le nombre de séquence est inférieur à 50, seuil utilisé dans l'approche de transcriptomique sans *a priori*. La couleur rouge indique une surexpression entre les deux traitements considérés. La couleur bleue indique une sous-expression entre les deux traitements considérés.

Les chiffres en gras à gauche indiquent :

1 : gènes responsables de la synthèse de la GMC oxidoréductase

2 : gènes de synthèse de cytochrome c impliqués probablement impliqués dans la maturation de la sous-unité GdhC de la GMC

3 : gènes de synthèse du système TAT responsable de la translocation au niveau du périplasma de la sous-unité GdhS de la GMC

4 : gènes codant d'autres potentielles glucose déshydrogénases

5 : gènes impliqués dans le métabolisme du gluconate

Label	Name	Product	TRANSCRIPTOMIC						PROTEOMIC					
			BPvsBCP		BPvsBBP		BCPvsBBP		BPvsBCP		BPvsBBP		BCPvsBBP	
			BP	BCP	BP	BBP	BCP	BBP	BP	BCP	BP	BBP	BCP	BBP
1	COLLI_v1_380041	<i>gdhS</i> Sorbitol/glucose/2-Keto-D-gluconate dehydrogenase, membrane-bound, gamma subunit	1792	818	n.s.	n.s.	978	2136	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
	COLLI_v1_380042	<i>gdhL</i> Glucose methanol choline dehydrogenase large subunit	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	2478	5137	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
	COLLI_v1_380043	<i>gdhC</i> Glucose/Gluconate/Sorbitol 2-dehydrogenase cytochrome subunit	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
2	COLLI_v1_490037	- Cytochrome c4	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	12900	5999	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	36	15
	COLLI_v1_490038	- Cytochrome c-type biogenesis protein Ccs1/ResB	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	3874	2086	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
	COLLI_v1_490039	- Cytochrome c-type biogenesis protein CcsA/ResC	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
3	COLLI_v1_490126	<i>tatA</i> Sec-independent protein translocase protein TatA	n.s.	n.s.	25200	11600	26000	11200	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
	COLLI_v1_490127	<i>tatB</i> Sec-independent protein translocase protein TatB	n.s.	n.s.	17000	8365	20800	8080	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
	COLLI_v1_490128	<i>tatC</i> twin arginine protein translocation system - TatC protein	n.s.	n.s.	2023	1218	2064	1176	n.s.	n.s.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
4	COLLI_v1_260043	<i>zwf</i> NADP(+)-dependent glucose-6-phosphate dehydrogenase	n.s.	n.s.	2859	10800	2864	10400	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	105	136
	COLLI_v1_260051	<i>zwf</i> NADP(+)-dependent glucose-6-phosphate dehydrogenase	n.s.	n.s.	3555	9645	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
	COLLI_v1_200088	<i>zwf</i> Glucose-6-phosphate 1-dehydrogenase 1	n.s.	n.s.	2957	1351	2717	1305	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
	COLLI_v1_690037	<i>udg</i> UDP-glucose 6-dehydrogenase	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
	COLLI_v1_200359	- Glucose / Sorbosone dehydrogenase family protein	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.d.	n.d.	n.s.	n.s.
5	COLLI_v1_200373	- 6-phosphogluconate dehydrogenase, NAD(+)-dependent, decarboxylating	n.s.	n.s.	9960	5299	8214	5119	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
	COLLI_v1_260341	<i>gnuT</i> Gluconate permease	n.s.	n.s.	2159	1503	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
	COLLI_v1_260346	- 2-dehydro-3-deoxygluconate kinase	n.s.	n.s.	2792	1308	2808	1263	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
	COLLI_v1_380033	<i>gntK</i> Gluconokinase	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
	COLLI_v1_370030	<i>adhB</i> Alcohol dehydrogenase (quinone), cytochrome c subunit	n.s.	n.s.	2826	1863	3135	1799	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
	COLLI_v1_180157	- 2-ketogluconate transporter	n.s.	n.s.	554	180	496	174	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
COLLI_v1_180158	<i>kdgK</i> 2-dehydro-3-deoxygluconokinase	n.s.	n.s.	1509	307	1553	297	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	
COLLI_v1_180156	<i>ghrB</i> glyoxylate reductase	n.s.	n.s.	680	223	618	216	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	
COLLI_v1_380032	<i>gntR</i> Gluconate utilization system Gnt-I transcriptional repressor	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	
COLLI_v1_180160	- 2-ketogluconate utilization repressor PtxS	n.s.	n.s.	1888	1090	1656	1053	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	
COLLI_v1_260040	<i>eda</i> KHG/KDPG aldolase	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	4036	7580	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	
COLLI_v1_260041	<i>edd</i> phosphogluconate dehydratase	n.s.	n.s.	12200	19200	9151	18500	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	51	87	
COLLI_v1_260042	<i>pgi</i> glucose-6-phosphate isomerase	n.s.	n.s.	7038	15000	6446	14500	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	50	72	

5.3.3.2. Les mécanismes d'acquisition du fer

Effet de la carence en Fe et Mg (BP vs BCP)

En considérant l'effet de carence (BP vs BCP), les gènes surexprimés en carence (BP) sont les gènes de transport de fer comme *exbB* et *exbD* (COLLI_v1_540053/COLLI_v1_540054). A l'inverse, le gène *bfr* responsable de la synthèse de bactéroferritine (système de stockage du fer) (COLLI_v1_540055) est surexprimé dans la condition de milieu complet (BCP) (Tableau 5.10).

Effet de la présence du minéral (BP vs BBP)

En considérant l'effet de la présence du minéral (BP vs BBP), les gènes surexprimés en présence du minéral (BBP) sont le gène *bfr* responsable du stockage du fer (bactéroferritine) et les gènes codant pour le système d'acquisition du fer FecIR. En revanche, les gènes surexprimés en absence de minéral (BP) sont trois gènes appartenant au cluster de gènes impliqué dans la synthèse de malléobactine (*i.e.*, *mbaF*, *mbaI* et *mbaB* correspondant respectivement à COLLI_v1_190024/ COLLI_v1_190027/ COLLI_v1_190033), les gènes codant pour le système d'acquisition du fer FTR (COLLI_v1_200271/ COLLI_v1_200272/ COLLI_v1_200273/ COLLI_v1_200274) et les gènes de transport du fer (*exbB* et *exbD* respectivement COLLI_v1_540053/COLLI_v1_540054).

Effet de la disponibilité en Fe et Mg (BBP vs BCP)

En comparant le milieu complet (BCP) et la condition pauvre avec minéral (BBP), les gènes surexprimés en présence du minéral sont trois gènes impliqués dans la synthèse de sidérophore (*mbaNDE* respectivement COLLI_v1_190031/COLLI_v1_190035/COLLI_v1_190037), le gène *iorA* (COLLI_v1_190038) potentiellement lié à la biosynthèse de sidérophore et le gène *bfr* de stockage du fer (bactéroferritine ; COLLI_v1_540055), le gène *fecR* (COLLI_v1_150003) et un gène lié au transport du fer (COLLI_v1_630039). Au contraire, les gènes surexprimés en absence du minéral sont les gènes du cluster FTR (COLLI_v1_200271/ COLLI_v1_200272/COLLI_v1_200273/COLLI_v1_200274) et le gène *exbD* responsable du transport du fer (COLLI_v1_540054).

6. Discussion

Ce chapitre avait pour but de (i) découvrir de potentiels nouveaux gènes de l'altération des minéraux ; (ii) d'étudier l'effet de la disponibilité en nutriments (fer et magnésium) et (iii) l'effet de la présence du minéral sur l'expression des gènes et la production des protéines par la souche modèle *Collimonas pratensis* PMB3(1). Des approches complémentaires de transcriptomique et protéomique couplées à des analyses chimiques ont été réalisées dans ce but.

6.1. Approche sans *a priori*

6.1.1. Vision globale des données

La combinaison des approches de transcriptomique et protéomique (par Mixomics) a permis d'avoir une vision globale du jeu de donnée. L'analyse multivariée (PLS) indique que les deux techniques mènent à une différenciation similaire des conditions testées (BP, BCP, et BBP). Notamment, les conditions de carence (BP) et de milieu complet (BCP) semblent très proches. Cela a été confirmé par l'analyse DESeq2 qui a permis de détecter (après filtrage) seulement 123 gènes différentiellement régulés et 20 protéines différentiellement produites. Il semblerait donc que l'effet de la disponibilité en nutriments Fe et Mg observé en comparant BP et BBP, n'entraîne pas de régulation forte des gènes de la souche *Collimonas pratensis* PMB3(1). Au contraire, l'analyse multivariée démontre une forte différenciation des gènes régulés entre la condition carencée avec minéral (BBP) par rapport aux conditions sans minéral (BP et BCP). Ce serait donc la présence du minéral qui entrainerait une réaction importante de la souche bactérienne comparé à l'effet de la disponibilité en nutriments. Cette hypothèse concorde avec une étude de protéomique dans laquelle la souche de *Cupriavidus metallidurans* CH34 présente une régulation plus importante des protéines produites en fonction de la présence de basalte par rapport à la disponibilité en fer et magnésium. La roche engendrerait une expression plus importante des mécanismes de résistance (pompes à efflux, résistance aux métaux lourds...) que les auteurs apparentent à un stress (Bryce *et al.*, 2016).

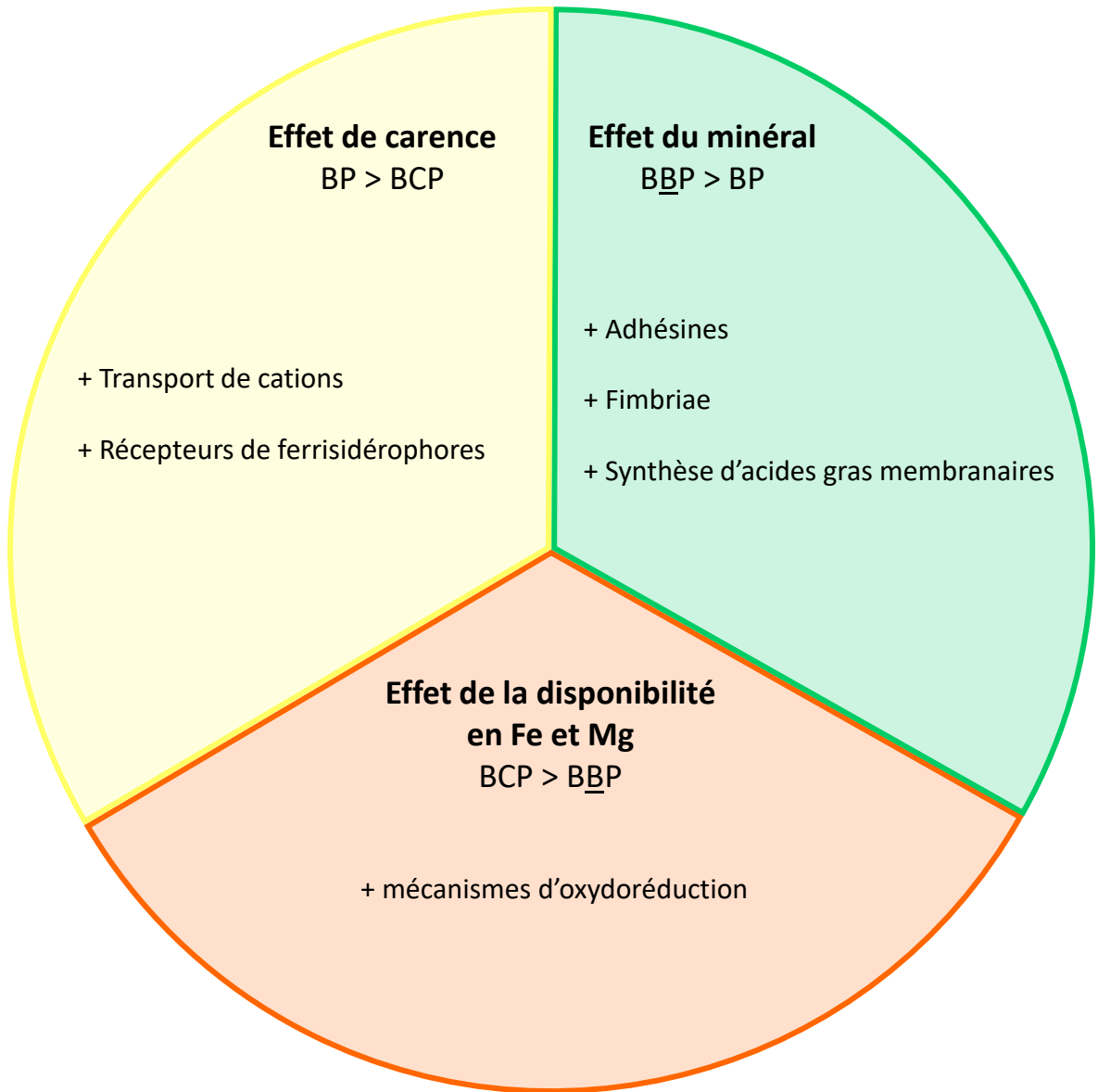


Figure 5.7 : Les grandes fonctions différentiellement régulées par la souche *Collimonas pratensis* PMB3(1) pour altérer la biotite dans différentes conditions

Ces conclusions sont tirées de l'analyse des top20 pour chaque comparaison et sont encore à affiner.

BP : BHm carencé en Fe et Mg sans minéral

BBP : BHm carencé en Fe et Mg avec minéral

BCP : BHm complet sans minéral

6.1.2. Analyse des top20

L'étude des 20 premiers DEG et DPP pour chaque condition a mis en évidence les grandes fonctions régulées par la souche de *Collimonas pratensis* PMB3(1) pour interagir avec la biotite dans les différentes conditions testées (Figure 5.7).

En **condition de carence (BP > BCP)**, la souche développe principalement des systèmes de transport de cations. Ces systèmes régulés démontrent que la souche met en place des mécanismes permettant d'acquérir les nutriments manquants dans le milieu de culture à savoir le Fe et Mg. De façon intéressante, le gène *exbB* est surexprimé en condition de carence (BP). Noinaj *et al.* ont indiqué que ce gène accompagné d'un gène codant un transporteur *tonB* et du gène *exbD* forment un système de transport (TonB-ExbB-ExbD) qui utilise la force proton motrice et qui transporte différentes molécules allant des sidérophores, de la vitamine B12, des complexes de nickel ou des carbohydrates (Noinaj *et al.*, 2010). De plus, le système CusABC ou CzcABC a été détecté en transcriptomique et protéomique en condition de carence (BP vs BCP) mais aussi en présence de minéral dans la comparaison **BBP vs BCP**. Ce système de résistance au cobalt, au cadmium et au zinc (Hassan *et al.*, 1999) est donc plutôt lié à l'effet de carence. De manière notable, ce système a été reporté comme différentiellement régulé dans une étude visant à déterminer l'effet de la carence en fer et l'effet de la présence de basalte sur la régulation des gènes de *Cupriavidus metallidurans* CH34 (Olsson-Francis *et al.*, 2010). L'opéron *czc* était surexprimé lorsque la bactérie était en condition de carence et en présence de minéral (Olsson-Francis *et al.*, 2010). Cela souligne que, pour des souches bactériennes différentes, certains gènes similaires semblent être exprimés en condition de carence.

En **présence du minéral (BBP > BP)**, la souche PMB3(1) exprime des gènes liés à l'adhésion comme les adhésines, fimbriae et des gènes de synthèse d'acides gras liés à la fluidité membranaire suggérant que la souche PMB3(1) développe une interaction forte avec le minéral. Cette information pourrait expliquer la biomasse moins importante mesurée en présence du minéral (BBP) comparé aux autres traitements ; les cellules étant attachées à la biotite, le dénombrement des bactéries dans le surnageant (sans biotite) ne permettrait pas d'accéder aux bactéries qui ont adhéré à la surface de la biotite. Dans le but d'évaluer le rôle d'un contact entre bactéries et minéral dans l'altération des minéraux, Ahmed *et al.* ont réalisé des expériences d'altération entre plusieurs souches bactériennes et la biotite en présence ou non d'une membrane séparant les deux entités. Il s'est avéré que le contact entre microorganismes

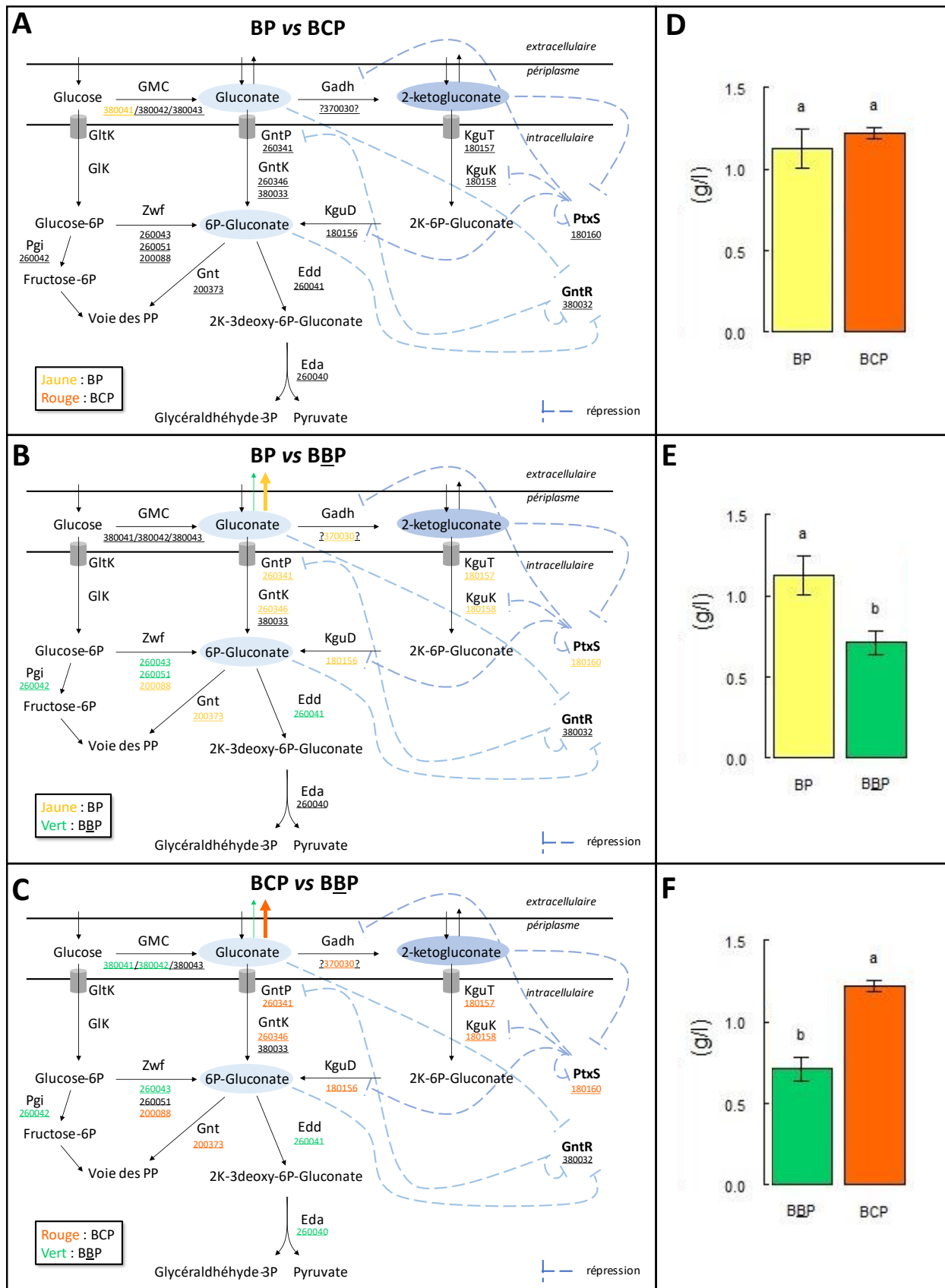


Figure 5.8 : Schéma hypothétique de la régulation des gènes du métabolisme du glucose par *Collimonas pratensis* PMB3(1) inspiré de des études de Daddaoua *et al.* 2010, 2017 sur *Pseudomonas putida*

Ce schéma indique les potentielles voies métaboliques du glucose de la souche PMB3(1) et le lien avec la mesure de gluconate extracellulaire (D, E, F). Les gènes différemment exprimés sont indiqués en couleur pour chaque comparaison BP vs BCP (A), BP vs BBP (B), BCP vs BBP (C). Plus précisément, les gènes surexprimés en condition de carence (BP), en présence de minéral (BBP) et en milieu complet (BCP) sont indiqués respectivement en jaune, vert et rouge. Les numéros d'accèsion des gènes de *Collimonas pratensis* PMB3(1) sont soulignés.

Eda : 2-keto-3-deoxy gluconate aldolase
 Edd : Phosphogluconate déshydratase
 GadH : Gluconate déshydrogénase
 GIK : Glucokinase
 GltK : Glucose transporteur

GMC : Glucose/méthanol/choline oxydoréductase
 Gnt : 6-phosphogluconate déhydrogénase
 GntK : Gluconokinase
 GntP : Gluconate permease
 KguD : 2-ketogluconate reductase

KguK : 2-ketogluconate kinase
 KguT : 2-ketogluconate transporter
 Pgi : Glucose-6-phosphate isomérase
 Zwf : Glucose 6-phosphate 1-déshydrogénase

et biotite entraînait une meilleure dissolution des éléments issus de la biotite comparé à une interaction sans contact (Ahmed and Holmström, 2015).

En présence de minéral, la souche PMB3(1) surexprime certaines enzymes d'oxydoréduction. La détermination du mode d'action réel de ces enzymes et leur localisation cellulaire demande un temps d'analyse plus long qui permettra peut-être de développer des hypothèses sur de nouveaux mécanismes d'altération des minéraux.

6.2. Approche avec *a priori*

6.2.1. La régulation de l'expression des enzymes liées au métabolisme du glucose

Les bactéries sont capables d'utiliser les différentes voies métaboliques pour utiliser un même substrat. C'est le cas du glucose par exemple dont les voies métaboliques sont utilisées de manière différente en fonction du microorganisme considéré (Fuhrer *et al.*, 2005). Pour un même organisme, les voies utilisées varient en fonction des conditions environnementales. En effet, la métabolisation de glucose marqué au ^{13}C par la souche de *Pseudomonas putida* a permis de démontrer que différentes voies métaboliques étaient utilisées (Sasnow *et al.*, 2016). Cette étude a pu démontrer qu'en condition de carence en fer, la souche de *Pseudomonas* utilisait environ 10 % du carbone assimilé (glucose) dans la production de biomasse, 10 % dans la production de sidérophore et environ 50 % dans la production de gluconate. En condition de carence, la voie d'oxydation directe du glucose est privilégiée permettant la sécrétion massive de gluconate dans le milieu extérieur. A l'inverse, en présence de fer, plus de 50 % du carbone assimilé est utilisé pour la production de biomasse particulièrement *via* les voies métaboliques de production de pyruvate.

Une représentation des voies métaboliques de la souche PMB3(1) a été proposée dans la Figure 5.8 inspirée de (Daddaoua *et al.*, 2010, 2017) sur une souche de *Pseudomonas putida*. D'après les résultats du CHAPITRE 5 et en prenant en compte l'effet de carence (BP vs BCP), seulement un gène est différentiellement exprimé, qui correspond à la petite sous-unité de la GMC oxydoréductase (*gdhS*) (Figure 5.8A). Le métabolisme de PMB3(1) ne semble donc pas réellement régulé en fonction de la présence ou non de fer. A l'inverse, l'effet de la présence du minéral semble entraîner des régulations métaboliques (Figure 5.8BC). Dans la condition avec minéral (BBP), que ce soit comparé à la condition de carence (BP) ou au milieu complet (BCP), la souche PMB3(1) exprime principalement des enzymes liées à la voie EMP et PP. Au contraire, les conditions sans minéral (BP et BCP) surexpriment les gènes responsables de la

synthèse d'enzymes de la voie d'oxydation directe du glucose. Ces résultats sont en accord avec les analyses chimiques réalisées, notamment la production de gluconate qui est significativement moins importante en présence de minéral (BBP) par rapport aux conditions BP et BCP. Ensemble, ces résultats suggèrent que *Collimonas pratensis* PMB3(1) module ses voies métaboliques en fonction de la présence du minéral.

6.2.2. Les systèmes d'acquisition du fer

La malléobactine ne semble pas être synthétisée au bout de 20 h quelles que soient les conditions testées (BP, BBP, BCP). Deux hypothèses sont proposées : (i) la production de protons par la GMC oxydoréductase est très rapide car le glucose est directement accessible dans le milieu, l'acidification du milieu est donc réalisée en quelques heures ce qui entraîne une acidolyse de la biotite. La biotite libère alors son contenu chimique dans le milieu dont du fer (0.5 mg/l en 20 h), cette quantité de fer pourrait être suffisante pour inhiber la synthèse de sidérophore. Néanmoins, dans le CHAPITRE 3 j'ai pu démontrer que la concentration minimale de Fe(III) inhibant la production de sidérophore était de 0.8 mg/l (ii) la synthèse de sidérophore passe par une voie non-ribosomale (NRPS) qui demande donc la synthèse de protéines dites NRPS qui servent ensuite à recruter des acides aminés pour synthétiser le sidérophore. Ce système est probablement plus long à mettre en place qu'une simple transcription/traduction. Ainsi, au bout de 20 h, la souche PMB3(1) n'a pas encore eu le temps de mettre en place cette machinerie. Notamment, des protéines du cluster de synthèse de sidérophore (protéines Mba) ont été détectées à 44 et 68 h dans la condition de carence (BP).

Il est possible que la souche PMB3(1) privilégie à 20 h d'autres mécanismes d'acquisition du fer plus rapides et moins coûteux en énergie comme le système FTR ou FecIR. Le système FTR, exprimé en absence de minéral, est un système déjà décrit chez certains *Burkholderia* et connu comme un système d'acquisition du fer alternatif des sidérophores. Notamment, Mathew *et al.* ont montrés qu'un mutant de *Burkholderia cenocepacia* incapable de produire de sidérophores était tout de même capable de croître dans un milieu carencé en fer, mais un double mutant muté au niveau de la production de sidérophore et de son système FTR n'était plus capable de croître en milieu carencé (Mathew *et al.*, 2014). Un autre système d'acquisition du fer a été détecté chez la souche PMB3(1), le système FecIR qui est surexprimé en présence du minéral (BBP). Ce système serait plutôt lié à la régulation du transport de complexes citrate-Fe(III) (Braun *et al.*, 2003).

6.3. Comparaison avec PML1(12)

Le design expérimental réalisé dans ce chapitre avait pour intérêt d'être très proche de celui proposé dans l'étude de Uroz *et al.* sur la souche de *Caballeronia mineralivorans* PML1(12) (Uroz *et al.*, 2020). Notamment l'effet de carence et l'effet de la présence du minéral après 20 h d'incubation peuvent être comparés (GB *vs* GBwB pour PML1(12) et BP *vs* BBP pour PMB3(1)).

6.3.1. Effet de carence

En condition de carence (ce qui équivaut à GB > GBwB pour PML1(12) et BP > BBP pour PMB3(1)), au bout de 20 h d'incubation, la souche PML1(12) est capable de (i) activer des gènes codant un potentiel sidérophore et d'autres systèmes d'acquisition du fer (déferrochélatase), (ii) de synthétiser du gluconate et (iii) de produire des porines. Les données obtenues pour la souche de PMB3(1) indiquent que ces deux souches proposent dans les mêmes conditions des mécanismes similaires comme des systèmes de transports d'ions ou d'oligosaccharides. Mais ces souches diffèrent notamment sur la synthèse de sidérophores qui était exprimés dès les 20 premières heures pour la souche PML1(12) mais pas pour la souche PMB3(1). Cependant, d'autres systèmes d'acquisition du fer sont détectés pour la souche PMB3(1) comme le système FTR. De façon globale, les deux souches développent donc des mécanismes similaires mais portés par des gènes et systèmes différents en condition de carence.

6.3.2. Effet de la présence du minéral

En présence du minéral (ce qui équivaut à GBwB > GB pour PML1(12) et BBP > BP pour PMB3(1)), la souche PML1(12) exprime des mécanismes liés au chimiotactisme, à la mobilité et au transport de NH₄⁺. Ces résultats suggèrent que la souche PML1(12) détecte la présence du minéral et se déplace, mais ne présente pas de liaison forte avec le minéral contrairement à PMB3(1) qui exprime des systèmes d'adhésion suggérant une interaction plus forte.

Cette comparaison entre les deux souches PML1(12) et PMB3(1) démontre que certains mécanismes sont conservés en condition de carence même s'ils ne sont pas exprimés par les mêmes gènes. Au contraire, en présence du minéral les deux souches développent des réponses différentes. Notamment, les analyses chimiques démontrent que l'altération de la biotite est 3 à

4 fois plus importante lorsque le minéral est en présence de PML1(12) par rapport à PMB3(1). Ces résultats suggèrent que les mécanismes moléculaires développés par PML1(12) conduisent à une altération du minéral plus efficace que ceux de PMB3(1) dans les conditions testées.

7. Conclusion

Ces travaux ont permis de démontrer que la souche PMB3(1) était capable de réguler l'expression de ses gènes et la production de ses protéines en fonction de la disponibilité en fer et magnésium mais surtout en fonction de la présence du minéral. En condition de carence, la souche PMB3(1) exprime des systèmes de transport d'ions. En présence de minéral, elle développe des mécanismes d'adhésion, et d'oxydoréduction. De manière intéressante, la présence du minéral influence également les voies métaboliques mises en jeu lors de l'utilisation du glucose. En absence de minéral, la voie d'oxydation directe du glucose est favorisée. De plus, un résultat important de cette étude est que la GMC et la malléobactine ne sont pas différenciellement régulées en fonction de la présence/absence du minéral ce qui pose la question de la spécificité du mécanisme pour l'altération. Une analyse plus poussée des résultats aux différents temps permettra d'avoir une meilleure compréhension des mécanismes moléculaires régulés lors de l'interaction entre bactéries et minéraux.

CONCLUSION GENERALE
ET PERSPECTIVES

Box 1 : “ Take Home Messages ”

Des approches complémentaires avec et sans *a priori* ainsi que des techniques variées allant de la biologie moléculaire et génétique bactérienne à des analyses chimiques et géochimiques ont permis d’apporter de nouvelles réponses à la problématique de la génétique de l’altération des minéraux :

CHAPITRE 1

- ☛ L’analyse rapide du génome de PMB3(1) a mis en évidence plusieurs gènes cibles dont une région potentiellement impliquée dans la synthèse de sidérophore et a souligné l’absence de GDH-PQQ et de gènes de synthèse de PQQ démontrant l’importance de réaliser une démarche sans *a priori*.

CHAPITRE 2

- ☛ La création d’une banque de mutants aléatoires ainsi que la sélection des mutants d’intérêt par différents biotests a entraîné la découverte d’un nouveau type de glucose déshydrogénase impliquée dans l’altération des minéraux : une GMC oxydoréductase FAD dépendante.
- ☛ Cette GMC oxydoréductase convertit le glucose en gluconate et produit un proton qui acidifie le milieu et altère les minéraux par acidolyse.

CHAPITRE 3

- ☛ La création d’un mutant ciblé sur le gène *mbaA* responsable de la synthèse de sidérophore a permis de caractériser chimiquement le premier sidérophore d’une souche de *Collimonas*. La souche PMB3(1) synthétise donc de la malléobactine contrairement aux prédictions bioinformatiques qui indiquaient la synthèse d’ornibactine. Cette découverte souligne les faiblesses des prédictions bioinformatiques et surtout l’importance de continuer les démonstrations expérimentales.
- ☛ J’ai pu démontrer l’implication de la malléobactine dans l’altération de l’hématite. Cette démonstration réalisée dans un milieu tamponné démontre que cette altération se fait par complexolyse.

CHAPITRE 4

- ☛ La souche PMB3(1) est capable d’altérer plusieurs types de minéraux.
- ☛ Les deux agents altérants (GMC et malléobactine) n’ont pas la même implication en fonction de l’environnement dans lequel se trouve la bactérie. Notamment le pouvoir tampon du milieu ainsi que la source de carbone ont un effet sur l’efficacité et les mécanismes moléculaires de l’altération des minéraux par la souche PMB3(1).
- ☛ La GMC oxydoréductase et la malléobactine sont impliqués dans l’altération des minéraux quel que soit le type de minéral. L’efficacité de ces mécanismes dépend principalement de l’altérabilité du minéral.

CHAPITRE 5

- ☛ Des approches de transcriptomique et protéomique combinées à des analyses chimiques ont permis de montrer que la souche PMB3(1) régule l’expression de ses gènes en fonction de la disponibilité en nutriment et de la présence du minéral. Notamment l’effet de la présence du minéral entraîne une régulation plus importante des gènes par rapport à un effet de carence.
- ☛ En présence du minéral, les cellules bactériennes activent des processus liés à l’adhésion, suggérant une interaction forte entre bactéries et minéral.
- ☛ La GMC oxydoréductase et la malléobactine ne semblent pas régulées en fonction de la présence du minéral ce qui pose la question de la spécificité de ces mécanismes pour l’altération des minéraux.

1. Synthèse des résultats

L'analyse de la littérature réalisée avant le début de ma thèse a révélé que très peu de gènes et de protéines liés à l'altération des minéraux par les bactéries avaient été démontrés. C'est pourquoi, l'objectif global de ma thèse était de **découvrir les gènes et les mécanismes moléculaires impliqués dans l'altération des minéraux par les bactéries du sol**. Mes recherches ont permis d'apporter de nouvelles réponses à la problématique de la génétique de l'altération des minéraux résumées dans la Box 1 et la Figure 6.1. Ces résultats ont été la base d'une réflexion plus approfondie présentée ci-après.

2. Discussion

2.1. Une approche sans *a priori* indispensable à la problématique des gènes de l'altération des minéraux

Les déterminants génétiques de l'altération des minéraux connus sont peu nombreux, la plupart sont suspectés et très peu ont été démontrés. Les gènes et protéines potentiellement impliqués dans l'altération des minéraux ont été présentés dans l'INTRODUCTION (§4). L'enzyme la plus décrite dans cette fonction est la glucose déshydrogénase PQQ-dépendante. L'étude du génome de PMB3(1) a révélé : (i) la présence de plusieurs glucose déshydrogénases mais aucune dépendantes de cofacteur PQQ, (ii) l'absence de gènes de synthèse du cofacteur PQQ, (iii) la présence d'un seul gène de synthèse de phénazine (*phzF*), (iv) la présence des gènes de synthèse de l'anhydrase carbonique et (v) la présence d'un cluster de gènes potentiellement impliqués dans la synthèse de sidérophores. Hormis le cluster de gènes de synthèse de sidérophore qui a fait l'objet du CHAPITRE 3 et l'anhydrase carbonique qui pourrait être impliquée dans l'altération des minéraux dans des conditions particulières, aucun gène candidat n'a été identifié dans le génome de PMB3(1). La faible quantité de gènes candidats souligne la nécessité de réaliser une approche sans *a priori* pour des fonctions encore peu connues comme l'altération des minéraux. L'approche sans *a priori* par mutagénèse aléatoire a, en effet, permis de découvrir une nouvelle enzyme impliquée dans l'altération des minéraux : une glucose/méthanol/choline oxydoréductase (GMC).

2.2. Le glucose et les mécanismes moléculaires de l'altération des minéraux

2.2.1. Les voies de métabolisation du glucose

Dans ma thèse, j'ai pu montrer que la souche de *Collimonas pratensis* PMB3(1) était capable d'altérer les minéraux. Les résultats du CHAPITRE 4 concordent avec la littérature qui souligne que les bactéries sont souvent plus efficaces pour altérer les minéraux en présence de glucose par rapport à d'autres sources de carbone (Nautiyal *et al.*, 2000; Hameeda *et al.*, 2006; Reyes *et al.*, 2006; Uroz *et al.*, 2007, 2009b; Patel *et al.*, 2008; Suleman *et al.*, 2018). Néanmoins, toutes les souches capables d'utiliser le glucose ne sont pas forcément capables d'altérer les minéraux. Il semblerait donc qu'il y ait un lien entre le glucose, son utilisation par les bactéries et l'altération des minéraux. Ce lien pourrait être expliqué par les voies métaboliques du glucose.

En effet, pour un même substrat, différentes voies métaboliques peuvent être utilisées par les bactéries pour le dégrader. En ce qui concerne le glucose, on peut citer la voie Embden–Meyerhof–Parnas (EMP) correspondant à la glycolyse, la voie des Pentoses Phosphates (PP), la voie Entner-Doudoroff (ED) et la voie d'oxydation directe du glucose (OD). Parmi toutes ces voies métaboliques, la voie d'oxydation directe du glucose est la seule à permettre une production de protons et d'acide gluconique au niveau du périplasme contrairement aux autres voies qui sont localisées au niveau cytoplasmique. Les protons et l'acide gluconique produits peuvent acidifier le milieu extérieur et conduire à l'altération des minéraux.

L'étude de Sasnow *et al.*, basée sur un suivi du ^{13}C a permis de montrer que l'utilisation des différentes voies métaboliques du glucose était modulée par les conditions environnementales et plus précisément la disponibilité en fer. Ils ont montré qu'en présence de fer (condition non carencée), une souche de *Pseudomonas* emploie la voie EMP par laquelle le carbone assimilé est utilisé principalement pour la production de biomasse (à plus de 50 %). A l'inverse, en condition de carence en fer, la voie d'oxydation directe du glucose (OD) est privilégiée. Dans ce cas, le carbone assimilé est utilisé pour la production de sidérophore (10 %), et de gluconate (50 %) (Sasnow *et al.*, 2016). La concentration de gluconate peut donc être un indicateur de la voie métabolique utilisée, même si d'autres variations physiologiques pourraient expliquer les différences. En me basant sur les travaux de Sasnow *et al.*, j'ai calculé la proportion de glucose utilisé pour la production de gluconate par la souche PMB3(1) en utilisant la quantité de gluconate mesuré dans le surnageant et la quantité de glucose initialement présente dans le milieu (données du CHAPITRE 5).

De façon intéressante, la souche PMB3(1) produit du gluconate en utilisant respectivement 51.4 %, 32.4 % et 55.9 % du glucose pour les conditions de carence en Fe et Mg (BP), en présence de minéral (BBP) et dans le milieu complet (BCP). Ainsi, il semblerait que la production de gluconate soit diminuée en présence du minéral (*i.e.*, biotite) suggérant que le minéral fournit une multitude d'éléments chimiques dans le milieu et serait plutôt considéré comme le milieu le plus riche d'après les résultats de Sasnow *et al.*, 2016. Cette conclusion est en accord avec les données de protéomique et transcriptomique où l'expression des gènes et la production de protéines de façon différentielle est plus importante dans la condition avec minéral. Sachant que le gluconate mesuré est extracellulaire et que les cellules bactériennes consomment une partie du gluconate produit, ces valeurs sont probablement sous-évaluées suggérant une utilisation massive du glucose pour synthétiser du gluconate. En ce qui concerne la production de biomasse par la souche PMB3(1), la mesure de l'absorbance à 595 nm a permis de montrer que la souche produisait plus de biomasse en présence de mannitol par rapport au glucose (dans le milieu BHm carencé en Fe et Mg). Une biomasse plus faible avec du glucose suggère donc une utilisation du carbone dans des mécanismes autres que la production de biomasse.

L'association de nos résultats et ceux de Sasnow *et al.* suggèrent que les bactéries sont capables de moduler leur physiologie en fonction de la disponibilité en nutriments et/ou de la présence du minéral. Ainsi en condition de carence, les bactéries développeraient des stratégies d'acquisition de nutriments (production de gluconate et sidérophores) au détriment de la production de biomasse.

2.2.2. Les glucose déshydrogénases impliquées dans la voie d'oxydation directe du glucose

La voie d'oxydation directe du glucose implique plusieurs enzymes. La première étape de la voie OD est la conversion du glucose en gluconate. Jusqu'à mes travaux de thèse, la seule enzyme connue pour cette fonction et impliquée dans l'altération des minéraux était la glucose déshydrogénase PQQ-dépendante. Mes travaux de thèse ont permis de découvrir une nouvelle enzyme impliquée dans cette voie : une glucose/méthanol/choline oxydoréductase (GMC). La production de gluconate dans le milieu extracellulaire chez la souche PMB3(1) et la conséquence de la mutation de différents gènes associés ont permis de mettre en évidence son activité de glucose déshydrogénase. De manière générale, plusieurs types de glucose déshydrogénases peuvent être retrouvées chez les bactéries : (i) des GDH PQQ-dépendantes,

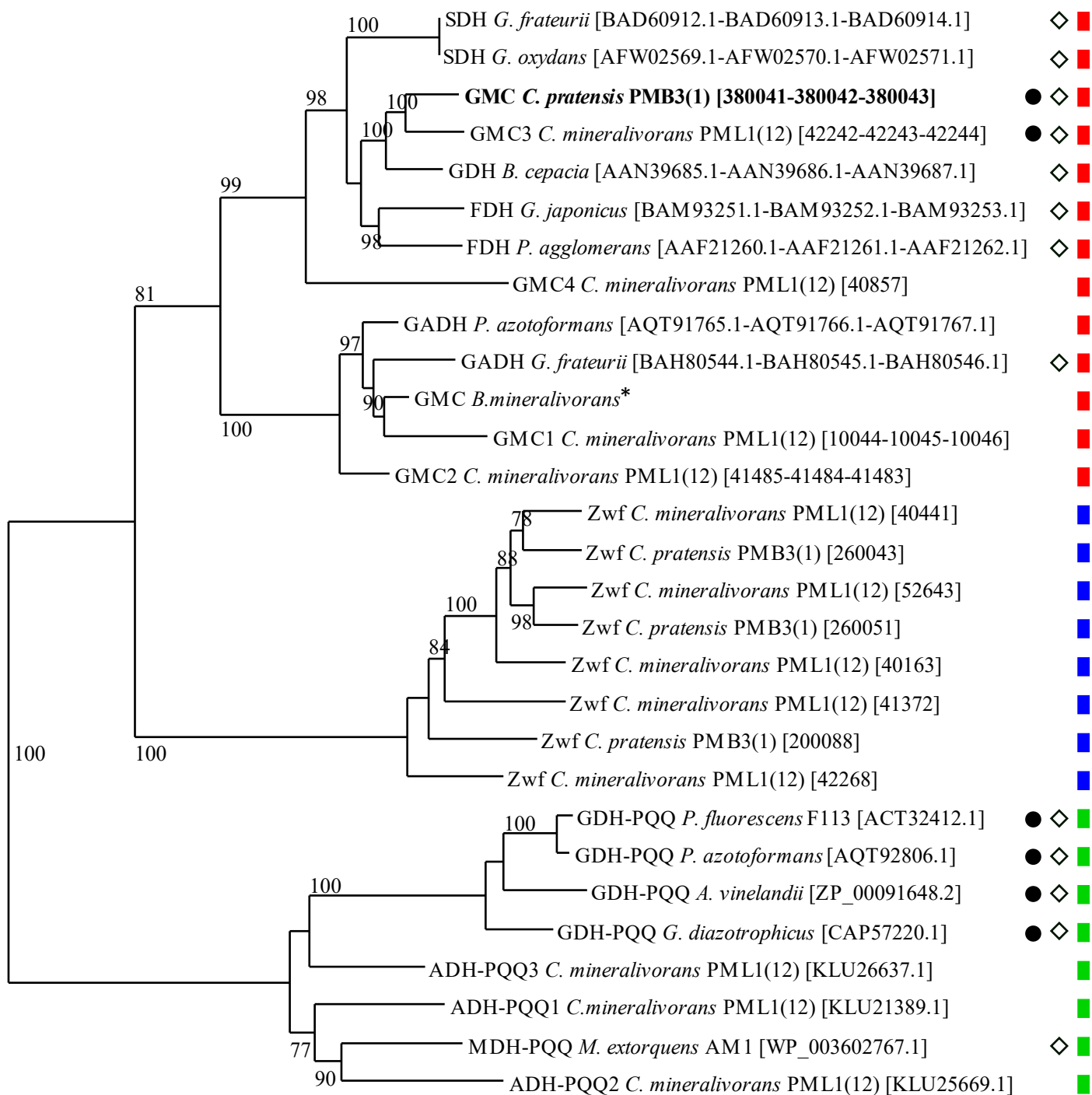


Figure 6.2 : Arbre phylogénétique des séquences protéiques des alcool déshydrogénases et enzymes appartenant à la famille des GMC (sous-unités small/large/cytochrome) et lien avec leur substrat et l'altération des minéraux

Les enzymes appartenant à la famille des Glucose/méthanol/choline sont indiquées en **rouge**. Parmi les GMC, des enzymes dont l'activité a été démontré expérimentalement ont été incluses dans l'analyse phylogénétique (losanges blancs : \diamond) dont des fructose déshydrogénases (FDH) (Kawai *et al.* 2013 ; Yum *et al.* 1997), glucose déshydrogénase (GDH) (Tsuya *et al.* 2006), sorbitol déshydrogénases (SDH) (Toyama *et al.* 2005) et gluconate déshydrogénase (GADH) (Saichana *et al.* 2009). Les glucoses déshydrogénases cytoplasmiques impliquées dans la glycolyse sont indiquées en **bleu** (Zwf). Les alcool déshydrogénases PQQ-dépendantes périplasmiques sont présentées en **vert**. Une méthanol déshydrogénase PQQ-dépendante (MDH-PQQ) dont l'activité a été démontrée expérimentalement a été ajoutée (Richardson *et al.* 1992). Les enzymes dont l'implication dans l'altération des minéraux a été démontrée sont indiquées par un cercle noir (\bullet). Les numéros d'accèsion sont présentés entre crochets.

*Séquence protéique de la GMC retrouvée chez *Burkholderia mineralivorans* WS-FJ9 dans l'étude de Zeng *et al.* 2017.

(ii) des GDH de la famille des GMC toutes deux localisées au niveau de la membrane cytoplasmique, (iii) tandis que les GDH du type Zwf sont localisées au niveau du cytoplasme. Néanmoins seules les GDH-PQQ ou les GMCs entraînent la production de protons qui peuvent se retrouver dans le milieu extracellulaire, contrairement aux enzymes Zwf.

Il semblerait que la souche *Collimonas pratensis* PMB3(1) ne possède qu'une seule GDH membranaire (la GMC oxydoréductase), tandis que toutes les autres GDH détectées dans son génome sont cytoplasmiques. Ces résultats d'analyse de génome associés aux expérimentations permettent de conclure que la GMC est la seule impliquée dans la voie d'OD. Toutefois, ce type d'organisation n'est pas retrouvé chez toutes les souches bactériennes. Par exemple, la souche *Caballeronia mineralivorans* PML1(12) (autre souche modèle du laboratoire efficace pour altérer) possède plusieurs enzymes périplasmiques probablement impliquées dans la conversion du glucose en gluconate, notamment, 3 alcool déshydrogénases PQQ-dépendantes et 4 GMC oxydoréductases (CHAPITRE 5 Tableau 5.1).

2.2.3. Etude phylogénétique des différentes déshydrogénases identifiées chez PMB3(1) et PML1(12)

La réalisation d'un arbre phylogénétique comprenant les GDH et GMC de PMB3(1) et PML1(12), des GDH-PQQ dépendantes dont l'implication dans l'altération a été démontrée, des GDH cytoplasmiques, ainsi que différents types de GMC m'a permis de réfléchir à l'activité de ces enzymes et leur implication dans l'altération des minéraux (Figure 6.2).

Dans un premier temps, on observe une forte séparation des glucose déshydrogénases cytoplasmiques (Zwf), des quinoprotéines et des GMC.

En ce qui concerne les GMC oxydoréductases, elles forment un cluster bien différencié des GDH-PQQ et des GDH cytoplasmiques (Zwf). La GMC3 de PML1(12) et la GMC de PMB3(1) sont très proches phylogénétiquement et se regroupent auprès d'une GDH de la famille des GMC oxydoréductases dont l'activité a été démontrée (Tsuya *et al.*, 2006). Cette proximité phylogénétique avec la GDH de la famille des GMC confirme que la GMC3 de PML1(12) et la GMC de PMB3(1) ont bien une activité glucose déshydrogénases. On peut également noter que les GMC1 et GMC2 de PML1(12) sont proches phylogénétiquement des gluconate déshydrogénases de la famille des GMC suggérant une activité de gluconate déshydrogénase.

En ce qui concerne les quinoprotéines récupérées à partir de différents génomes de bactéries capables d'altérer, les ADH-PQQ1 et ADH-PQQ2 se regroupent au niveau d'une méthanol déshydrogénase dont l'activité a été démontrée (Richardson and Anthony, 1992) tandis que

l'ADH-PQQ3 se rapproche phylogénétiquement des glucose déshydrogénases PQQ-dépendantes.

En conclusion, la souche PML1(12) ne posséderait que deux GDH membranaires : (i) une appartenant à la famille des GMC (GMC3) et (ii) une appartenant à la famille des quinoprotéines (ADH-PQQ3).

Cet arbre phylogénétique a également un intérêt en ce qui concerne la fonction d'altération des minéraux. En effet, certaines enzymes dont la fonction dans l'altération des minéraux a été démontrée ont été ajoutées permettant d'évaluer le lien entre séquences protéiques et altération (Figure 6.2 ; ronds noirs).

Parmi les GDH-PQQ-dépendantes, toutes les GDH dont l'implication dans l'altération des minéraux a été démontrée expérimentalement sont regroupées phylogénétiquement. L'ADH-PQQ3 est la plus éloignée, ce qui pose question sur son implication dans l'altération des minéraux. Ce résultat concorde avec l'étude de transcriptomique et protéomique de Uroz *et al.* qui suggère que seules les GMCs seraient impliquées dans l'altération des minéraux par la souche PML1(12) (Uroz *et al.*, 2020). De plus, la création de plusieurs banques de mutants aléatoires de la souche PML1(12) (réalisées durant la thèse de Cendrella Lepleux et ma thèse) a permis d'identifier un mutant impacté dans l'altération des minéraux et dont le gène muté était lié à la synthèse de la GMC3 (données non présentées).

En conclusion, malgré la présence de plusieurs putatives glucose déshydrogénases périplasmiques chez la souche PML1(12), la GMC3 serait la seule impliquée dans l'altération des minéraux. Pour confirmer cette hypothèse, il serait intéressant de créer un mutant ciblé sur l'ADH-PQQ3 et de vérifier son implication dans l'altération des minéraux en comparant souche sauvage et mutant. L'activité de glucose déshydrogénase de l'ADH-PQQ3 reste une supposition liée aux résultats de l'arbre phylogénétique et aux analyses de BLAST (NCBI), son activité réelle reste donc à démontrer. Si l'ADH-PQQ3 n'est pas une glucose déshydrogénase, alors la GMC3 serait la seule glucose déshydrogénase périplasmique et ainsi la seule impliquée dans la voie d'oxydation directe du glucose.

Un point important est que l'arbre présenté dans cette discussion n'est pas soutenu par de nombreuses séquences. En effet, il existe peu d'études qui ont démontré expérimentalement l'activité de GMCs et PQQ-déshydrogénases et qui font le lien avec les gènes impliqués, d'où

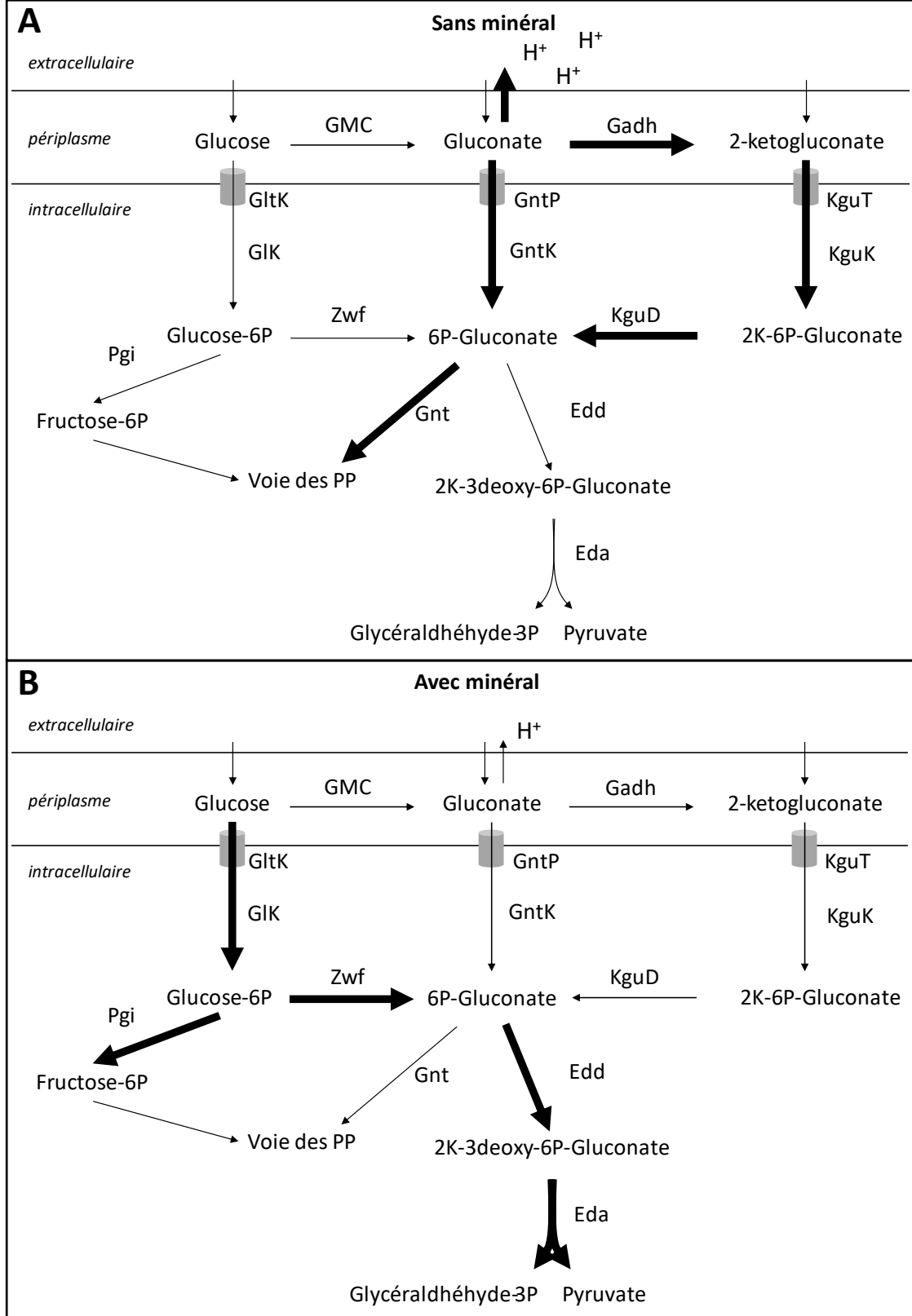


Figure 6.3 : Proposition de la régulation des enzymes liées aux voies métaboliques du glucose de la souche PMB3(1) en fonction de la absence/présence du minéral et lien avec l'acidolyse (inspiré de Daddaoua 2007, 2010)

Eda : 2-keto-3-deoxy gluconate aldolase

Edd : Phosphogluconate déshydrogénase

Gadh : Gluconate déshydrogénase

GIK : Glucokinase

GltK : Glucose transporter

GMC : Glucose/méthanol/choline oxydoréductase

Gnt : 6-phosphogluconate déshydrogénase

GntK : Gluconokinase

GntP : Gluconate permease

KguD : 2-ketogluconate reductase

KguK : 2-ketogluconate kinase

KguT : 2-ketogluconate transporter

Pgi : Glucose-6-phosphate isomérase

Zwf : Glucose 6-phosphate 1-déshydrogénase

la difficulté de trouver des séquences protéiques qui codent pour des enzymes dont l'activité a été démontrée.

Enfin, la capacité à altérer les minéraux n'est pas un trait fonctionnel pour les bactéries du genre *Burkholderia*. Certaines souches de *Burkholderia* sont en effet incapables d'altérer les minéraux ou très peu efficaces. Je pense notamment à la souche de *Burkholderia* PN3(3) isolée sur le même site que les souches PML1(12) et PMB3(1) (Uroz *et al.*, 2007, 2009b). Le séquençage du génome de telles bactéries (*i.e.*, qui n'altèrent pas et qui sont proches phylogénétiquement de bactéries altérantes) pourrait permettre de mieux comprendre les mécanismes moléculaires de l'altération voire d'en découvrir de nouveaux. En ce qui concerne les glucoses déshydrogénases, la souche PN3(3) est-elle capable d'utiliser la voie d'oxydation directe du glucose ? Si oui, quelle enzyme possède-telle ? Une GDH-PQQ, une GMC ou bien un autre type d'enzymes ? Quelles sont les différences en termes de séquence ?

2.2.4. Expression et régulation des enzymes liées aux voies métaboliques du glucose

Les résultats préliminaires du CHAPITRE 5 indiquent que les voies métaboliques, pour la souche modèle *Collimonas pratensis* PMB3(1) ne seraient pas régulées en fonction de la disponibilité en nutriments mais plutôt en fonction de la présence du minéral. En effet, les gènes de synthèse des enzymes impliquées dans la voie EMP semblent surexprimés en présence de minéral (BBP) tandis que ceux impliqués dans la voie OD sont surexprimés en absence de minéral (BP et BCP). Grâce à ces résultats je propose dans la Figure 6.3 un récapitulatif de la régulation des voies métaboliques en fonction de la présence du minéral.

La partie suivante se focalise sur les GDH impliquées dans la voie OD. L'expression des gènes de synthèse des GDH-PQQ a été étudiée sur des problématiques liées à la solubilisation du phosphate. Notamment, An *et al.* ont montré que la souche de *Pseudomonas putida* KT2440 surexprime les gènes de synthèse de GDH-PQQ en condition de carence en phosphate comparativement à une condition de présence de phosphate (An and Moe, 2016). Cette régulation a également été montrée chez une souche de *Pseudomonas frederiksbergensis* JW-SD2, où l'expression des gènes codant pour la GDH-PQQ évaluée par q-PCR diminue en fonction de la concentration en phosphate disponible (Zeng *et al.*, 2016). Etant donné que l'activité des GDH-PQQ entraîne une production de protons et en conséquence une altération

des minéraux, la souche bactérienne pourrait activer cette enzyme en condition de carence dans le but d'acquérir des nutriments piégés dans les minéraux.

En ce qui concerne les GMC, l'étude de Zeng *et al.* a montré pour une souche de *Burkholderia mineralivorans* qu'une GMC était surexprimée en carence de phosphate comparé à une condition non-carencée (Zeng *et al.*, 2017). Cependant, cette GMC semble plutôt avoir une activité de gluconate déshydrogénase d'après son positionnement dans l'arbre phylogénétique (Figure 6.2). D'après les résultats du CHAPITRE 5, la GMC est exprimée de façon basale. La présence du minéral et la carence en éléments nutritifs n'ont pas d'effet sur la production des sous-unités de la protéine. Cette information suggère que la GMC impliquée dans l'altération des minéraux n'est pas spécifique de la présence du minéral ni de la disponibilité en éléments nutritifs. De même, aucune différence d'expression des gènes codant la GMC3 de la souche de PML1(12) n'a pas été observée que ce soit en carence en Fe et Mg ou en présence/absence du minéral (Uroz *et al.*, 2020).

Les GDH-PQQ semblent donc présenter une régulation en fonction de la carence en nutriments inorganiques, mais la littérature supportant ce point est limitée. Au contraire, les GDH de la famille des GMC ne semblent pas être différentiellement régulées entre les différentes conditions testées. Néanmoins, la régulation des GMC pourrait se faire de manière indirecte par le système de transport TAT par exemple. Cette hypothèse est traitée dans une prochaine section (§2.4).

2.3. Les systèmes d'acquisition du fer

2.3.1. Les sidérophores

Peu d'études ont pu montrer l'implication des sidérophores dans l'altération des minéraux en condition biotique. Malgré la faible littérature sur le sujet, il a été montré que certains sidérophores étaient capables d'altérer les minéraux mais que ce n'était pas le cas de tous. Notamment, la souche de *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 est capable de produire deux sidérophores : la pyochéline et la pyoverdine. Néanmoins, il a été démontré que seule la pyoverdine est capable de conduire à une altération de la smectite (Reimann *et al.*, 1998; Ochsner *et al.*, 2002; Ferret *et al.*, 2014). Les auteurs ont expliqué cette différence par une affinité de la pyoverdine avec le fer plus forte que celle de la pyochéline. On peut donc supposer que les sidérophores ayant le plus d'affinité pour le fer sont les plus efficaces pour altérer. Quel est le seuil d'affinité au fer minimal nécessaire d'un sidérophore pour altérer les minéraux ? Ce

seuil varie-t-il en fonction des propriétés intrinsèques du minéral (ex : composition chimique, réactivité...)?

Les minéraux testés dans ma thèse (*i.e.*, hématite (CHAPITRE 3), biotite, olivine, grenat (CHAPITRE 4)) ont tous la particularité de contenir du fer. Il a été démontré que les sidérophores peuvent chélater d'autres ions que le fer notamment des ions di- ou trivalent comme le zinc, le cobalt, l'aluminium... (Johnstone and Nolan, 2015; Patel *et al.*, 2018). On peut citer par exemple la pyoverdine et la desferrioxamine-B qui sont capables de chélater le manganèse Mn(III) (Parker *et al.*, 2004; Harrington *et al.*, 2012), mais cela n'a jamais été étudié pour la malléobactine. Si l'on considère que certains sidérophores sont capables de chélater d'autres ions que le fer, on peut alors imaginer qu'ils puissent être impliqués dans l'altération d'autres minéraux ne contenant pas de fer. Cette hypothèse n'a encore jamais été testée, c'est pour répondre à ce questionnement qu'un test d'altération sur un minéral ne contenant pas de fer (*i.e.*, apatite) est envisagé (perspectives §4.2).

2.3.2. La production du sidérophore et l'expression des gènes de synthèse de sidérophore sont-elles régulées ?

Dans ma thèse, je me suis intéressée tout d'abord à la production de sidérophore par la souche PMB3(1) en fonction de différentes concentrations en éléments chimiques (Fe, Al et Mn), puis, à l'expression des gènes de synthèse de sidérophore en fonction de la disponibilité en Fe et Mg et la présence/absence du minéral.

2.3.2.1. Impact de la disponibilité en métaux (Fe, Al et Mn) sur la production de malléobactine

Tout d'abord, j'ai pu montrer que la synthèse de malléobactine était inhibée par une concentration en fer soluble supérieure à 0.8 mg/l (CHAPITRE 3). Sachant que les sidérophores sont capables de chélater d'autres ions que le fer, je me suis aussi intéressée à l'influence de l'aluminium et du manganèse (éléments pouvant être contenus dans les minéraux du sol) sur la production de sidérophores. Ces expériences non publiées ont démontré qu'en absence d'aluminium la production de sidérophore est activée mais ne l'est plus à 1 mg/l, signifiant que la concentration minimale inhibitrice est comprise entre 0 et 1 mg/l d'aluminium (Al(III))

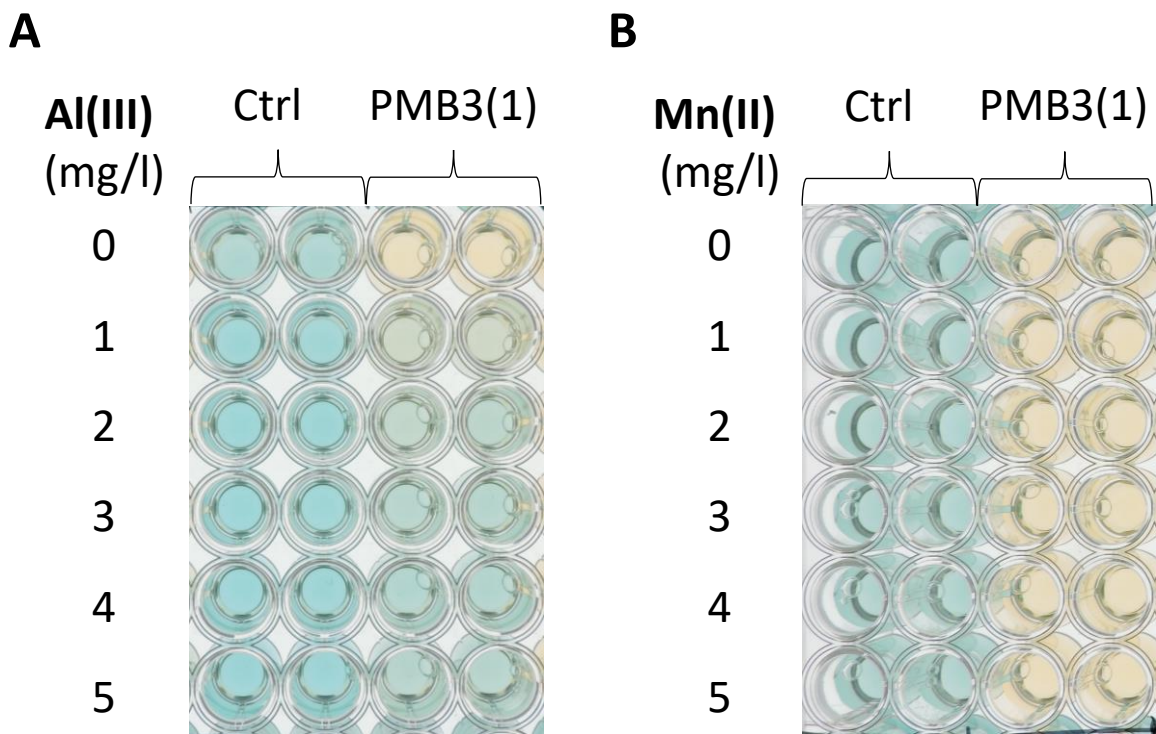


Figure 6.4 : Production de la malléobactine par la souche PMB3(1) en fonction de la concentration en aluminium ou manganèse

La souche PMB3(1) a été inoculée en présence de différentes concentrations en aluminium et manganèse. Dans une microplaque de 96 puits, 10 µl de suspension calibrée à DO = 0.9 de la souche PMB3(1) ont été inoculés dans 180 µl de milieu AB mannitol dépourvu de fer, aluminium et manganèse, supplémenté de 10 µl de solution d'aluminium (**A**) ou de manganèse (**B**). Différentes solutions de $\text{AlCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ou de $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ ont été préparées dans de l'eau mQ pour obtenir les concentrations finales de Al ou de Mn suivantes 0 ; 1 ; 2 ; 3 ; 4 ; 5 mg/l. Après trois jours d'incubation, la microplaque a été centrifugée et 100 µl de surnageant ont été transférés dans 100 µl de solution CAS liquide. Un contrôle non inoculé (Ctrl) a également été testé.

Les puits de couleur jaune indique que le sidérophore a été produit.

(Figure 6.4). A l'inverse, le manganèse (Mn(II)) ne semble pas inhiber la production de sidérophore quelles que soient les concentrations testées (de 0 à 5 mg/l).

2.3.2.2. Régulation de l'expression des gènes de synthèse de sidérophore

J'ai pu montrer que les sidérophores participaient à l'altération des minéraux mais uniquement dans certaines conditions environnementales. En effet dans le CHAPITRE 4, la comparaison entre la souche sauvage et le mutant Δ NRPS a permis de montrer que le mutant Δ NRPS n'est plus capable d'altérer les minéraux lorsque l'acidolyse est inhibée (tampon fort). A l'inverse, en condition d'acidolyse (tampon faible), le mutant et la souche sauvage altèrent les minéraux de façon identique. Cette différence peut être expliquée soit par la régulation des gènes de synthèse de sidérophores soit par une inhibition de l'activité du sidérophore en l'absence de tampon. Les expériences de transcriptomique et protéomique du CHAPITRE 5 ont permis de répondre à cette interrogation. Après 20 h d'incubation dans le milieu BHm glucose (milieu faiblement tamponné), les protéines de synthèse de sidérophores (Mba) n'ont pas été détectées en protéomique et l'expression des gènes était faible en transcriptomique. Cela suggère que l'expression de la malléobactine est inhibée dans le milieu BHm glucose à 20 h. Mais les analyses préliminaires de protéomique aux temps 44 et 68 h permettent de détecter les protéines de synthèse de sidérophore. De façon intéressante, la production de sidérophore par la souche *Cupriavidus metallidurans* CH34 débute après environ 15 h d'incubation dans un milieu carencé et atteint son maximum au bout de 24 h, en parallèle, la croissance de la souche CH34 atteint un plateau au bout de 30 h (Olsson-Francis *et al.*, 2010). La souche *Burkholderia xenovorans* LB400 débute quant-à-elle la production de sidérophore après 36 h d'incubation en milieu carencé et atteint son maximum à 48 h, sachant que la phase stationnaire de croissance est atteinte à 60 h (Vargas-Straube *et al.*, 2016). Il semblerait donc que la production de sidérophore n'est pas immédiate et demande un temps de production relativement long qui dépend de la vitesse de croissance de la souche bactérienne considérée. La souche de PMB3(1) a une croissance relativement lente dans le milieu AB mannitol carencé en fer (atteinte du plateau à environ 72 h) suggérant une production de sidérophore au-delà des 36 h d'incubation.

La synthèse de sidérophore étant liée à une voie non-ribosomale, elle nécessite probablement un temps plus lent qu'une transcription/traduction. Ainsi à 20 h le sidérophore n'est pas synthétisé d'après nos données de transcriptomique et protéomique et d'autres systèmes

d'acquisition du fer sont privilégiés (comme les systèmes FTR, TonB-ExbB-ExbD et FecIR ; §2.3.3). Durant cette période la souche bactérienne mobilise probablement ses réserves intracellulaires. Après 44 et 68 h d'incubation, les protéines de synthèse de sidérophore sont produites en milieu BHm glucose. Néanmoins, l'activité de complexation du sidérophore est probablement limitée par le pH du milieu BHm glucose (tampon faible, pH = 3.0 - 3.5 après acidification de la souche bactérienne). Les sidérophores peuvent être considérés comme des acides car ils contiennent des fonctions carboxyles (-COOH) ou alcools (-OH). En tant qu'acides, ils peuvent avoir tendance à se dissocier en solution aqueuse en libérant des ions H⁺ diminuant ainsi le pH du milieu. Leur tendance à se dissocier est caractérisée par leurs valeurs de pKa : plus la valeur de pKa est basse, plus l'acide est fort. Comme les formes déprotonées (-O⁻) sont généralement responsables de la complexation des métaux, les valeurs de pKa des sidérophores sont importantes car elles contrôlent leur efficacité à un pH donné (Rapti *et al.*, 2021). Ainsi, plus le pKa est faible plus la capacité à complexer les métaux est importante à pH acide. A titre d'exemple, la desferrioxamine B (DFO-B) possède les pKa 8.32, 9.16, 9.94 et 11.44 lui conférant une capacité de chélation des métaux à pH neutre voire basique. A l'inverse, la pyoverdine a des valeurs de pKa de 2.72, 3.48, 4.97, 6.40, 8.12, 9.56 et 10.24 résultant à un pouvoir complexant à des pH acides jusqu'à neutres (Boukhalifa *et al.*, 2006). De manière générale, on considère que les sidérophores de type hydroxamate (grande famille de sidérophores qui inclue la malléobactine) ont des valeurs de pKa entre 8.5 et 11 (Singh *et al.*, 2015). Dans ce contexte, il est probable que la malléobactine possède un pKa élevé ne lui permettant pas d'avoir un pouvoir complexant à pH acide.

2.3.3. Autres systèmes d'acquisition du fer

Hormis la présence du sidérophore, la plupart des souches de *Collimonas* possèdent d'autres systèmes d'acquisition du fer. Song *et al.* ont pu le démontrer dans une analyse de génomique comparative sur 6 souches de *Collimonas* (Ter331, Ter6, Ter91, Ter291, Ter10, Ter282) (Song *et al.*, 2015). Ils ont identifié les systèmes TonB-ExbB-ExbD, FecIR, FtrABCD et Hmu. D'après une analyse rapide du génome de la souche PMB3(1), les systèmes TonB-ExbB-ExbD, et FtrABCD ont été identifiés ainsi que les gènes *fecIR* et *fecA*.

- Les complexes de fer(III) (*i.e.*, ferrisidérophores, citrate-Fe(III)...) demandent de l'énergie pour être transportés du milieu extérieur jusqu'au périplasme. Cette énergie est fournie par le gradient de charge électrochimique de la membrane plasmique et est

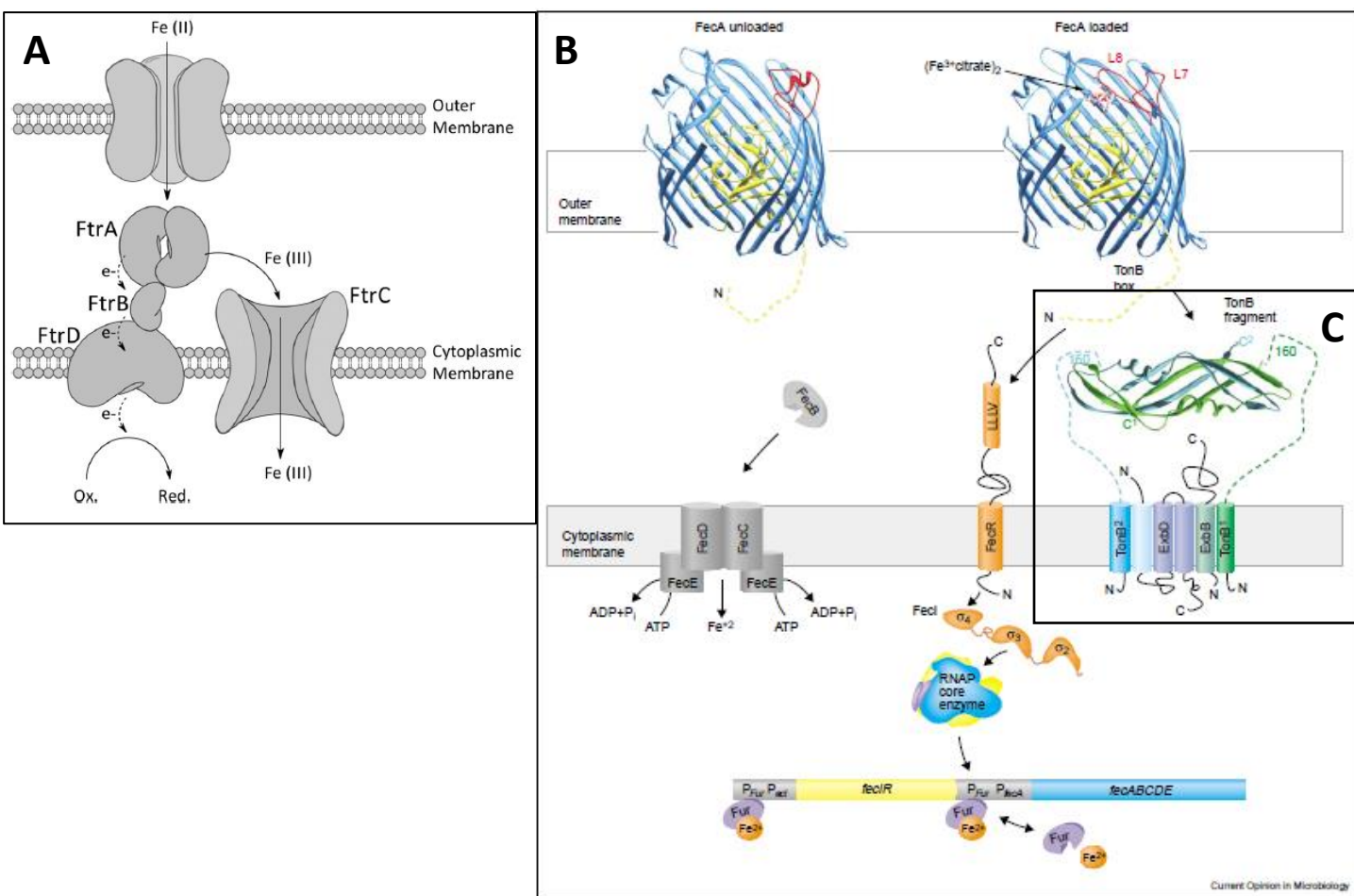


Figure 6.5 : Les systèmes d'acquisition du fer FtrABCD (Brickman *et al.* 2012) et FecIR, TonB-ExbB-ExbD (Braun *et al.* 2003)

Le système FtrABCD est responsable de l'utilisation de fer ferreux (Fe(II)) (A). Le Fe(II) est internalisé *via* une porine localisée au niveau de la membrane externe et est lié à la protéine FtrA dans le périplasm. Le Fe(II) est oxydé par l'enzyme FtrB puis le Fe(III) est transloqué dans le cytoplasme par la perméase FtrC. Les systèmes de transport et de régulation du citrate ferrique sont présente (B). Le complexe citrate-Fe(III) est reconnu et fixé par la protéine FecA au niveau de la membrane externe. La fixation du complexe entraîne des modifications structurales de la protéine FecA qui mène à une cascade de signaux. FecA interagit avec FecR qui transmet le signal au niveau de la membrane plasmique et active le facteur sigma FecI. FecI, par liaison à l'ARN polymérase initie la transcription du cluster *fecABCDE*. Les protéines FecBCDE sont responsables du transport du complexe citrate-Fe(III) jusque dans le cytoplasme. L'expression de FecIR est sous la répression du régulateur Fur qui se lie au fer et inhibe la transcription de FecIR. Le système TonB-ExbB-ExbD est nécessaire à FecA pour transporter le complexe citrate-Fe(III) et pour transmettre la cascade de signaux (C).

délivrée par le complexe protéique transducteur d'énergie TonB-ExbB-ExbD (Andrews *et al.*, 2003) (Figure 6.5C). Ce système peut être impliqué dans l'acquisition du fer qu'il soit complexé par un sidérophore ou par d'autres molécules comme le citrate (Noinaj *et al.*, 2010).

- En considérant le système FecABCDEIR, Braun *et al.* ont proposé qu'il soit dépendant de l'énergie fournie par TonB-ExbB-ExbD. Ce système FecABCDEIR est responsable de l'acquisition de fer ferrique (Fe(III)) complexé au citrate. La protéine FecA est une perméase qui fixe le complexe citrate-Fe(III) et le transporte du milieu extracellulaire au périplasma grâce au transducteur d'énergie TonB-ExbB-ExbD (Braun *et al.*, 2003). Le système FecBCDE est un transporteur ABC qui permet ensuite la translocation du complexe citrate-Fe(III) dans le cytoplasme. Le système FecABCDE est régulé par FecIR lui-même régulé par le régulateur Fur (Figure 6.5B) (Welz and Braun, 1998; Stiefel *et al.*, 2001).
- Le système FtrABCD, quant-à-lui, est un système d'acquisition et de transport de fer ferreux (Fe²⁺) sous forme soluble et indépendant du système TonB-ExbB-ExbD (Brickman and Armstrong, 2012; Elhassanny *et al.*, 2013) (Figure 6.5A).

Si l'on s'intéresse à la souche PMB3(1), cette souche possède plusieurs systèmes d'acquisition du fer : (i) le système FecAIR, (ii) TonB-ExbB-ExbD et (iii) FtrABCD. Dans le CHAPITRE 5, les analyses de transcriptomique à 20 h ont permis de détecter l'expression différenciée de gènes responsables de la synthèse de systèmes d'acquisition du fer. Notamment, le cluster de gènes *ftrABCD*, et *tonBexbBexbD* est surexprimé en absence de minéral tandis que les gènes *fecIR* sont surexprimés en présence du minéral. Les régulateurs FecIR semblent donc répondre à la présence du minéral suggérant un mécanisme spécifique. L'expression différenciée de FecIR pourrait indiquer une régulation positive de FecA dans le but d'acquérir du fer(III) sous forme de complexe avec le citrate. Néanmoins, d'après les analyses chimiques du surnageant réalisées durant ma thèse, le citrate n'était pas produit dans le milieu extérieur.

En ce qui concerne l'implication de ces systèmes dans l'altération des minéraux, il faut noter que les systèmes cités ci-dessus sont plutôt liés au transport du fer soluble (FtrABCD) ou du fer complexé au sidérophore ou citrate (TonB-ExbB-ExbD et FecIRA). Ces systèmes n'agissent donc pas directement sur le minéral mais pourraient agir indirectement en modifiant l'équilibre chimique de la solution incitant une dissolution passive du minéral.

2.4. Rôle indirect du système TAT dans l'altération des minéraux

2.4.1. Les protéines transportées par le système TAT

Le système de « Translocation Twin Arginine » appelé TAT est un système localisé au niveau de la membrane plasmique permettant le transport de protéines du cytoplasme vers le périplasme. Il est activé par la force proton-motrice et est retrouvé chez les bactéries, les archées et certains eucaryotes (Palmer and Berks, 2012). Les protéines bénéficiant de ce transport sont reconnues par le système grâce à une succession de deux arginines dans leur séquence protéique appelée « TAT signal » (Berks *et al.*, 2000).

L'approche sans *a priori* de mutagenèse aléatoire développée dans le CHAPITRE 2 a permis d'identifier le mutant 34(11H) de la souche PMB3(1) impacté dans l'altération des minéraux. Pour ce mutant, l'insertion du plasposon a été localisée au niveau des gènes *tatABC*. De façon intéressante, la création d'une banque de mutant aléatoire de la souche *Caballeronia mineralivorans* PML1(12) et le criblage de cette banque sur des biotests mimant l'altération des minéraux a permis également d'obtenir un mutant Δ *tatABC* impacté dans sa capacité à altérer les minéraux. Le système TAT semble donc impliqué dans l'altération des minéraux.

Pour expliquer son implication dans l'altération des minéraux, deux hypothèses sont proposées et détaillées ci-dessous :

- Hypothèse 1 :

Le système TAT utilise la force proton-motrice comme source d'énergie et ces protons pourraient jouer un rôle dans l'altération. Alder *et al.* ont estimé que la translocation d'une seule protéine consomme 10^4 protons et le coût total de l'exportation de toutes les protéines TAT d'une cellule est d'environ 3 % de son énergie totale (Alder and Theg, 2003). L'acidification étant l'un des principaux mécanismes moléculaires utilisés par les bactéries pour altérer les minéraux, une hypothèse est que la force proton-motrice participerait à la dissolution des minéraux lorsque les protons sont transportés du cytoplasme vers le périplasme. Les protons diffuseraient alors potentiellement dans le milieu environnant. Néanmoins, aucune étude n'a rapporté une telle acidification (Driessen and Wickner, 1991).

- Hypothèse 2 :

Le système TAT est impliqué dans la capacité à altérer les minéraux du fait des protéines transportées. Les analyses bioinformatiques (TATfinder) ont prédit qu'un total de 74 protéines présenteraient un signal TAT défini comme SRRXFLK (CHAPITRE 2 §3 Tableau S.4). Parmi ces 74 protéines on pourra noter la présence de :

- La petite sous-unité de la GMC oxydoréductase (GdhS) identifiée dans le CHAPITRE 2. D'après la littérature sur le sujet, la sous-unité GdhS se lierait à la sous-unité GdhL elle-même liée à son cofacteur (FAD) dans le cytoplasme formant le complexe GdhS-GdhL-FAD. La sous-unité GdhS, grâce à son signal TAT permet la translocation du complexe au niveau du périplasme permettant son action. La sous-unité cytochrome (GdhC), quant-à-elle, est transloquée dans le périplasme par le système de maturation ResABC.
- La protéine IorB. Les gènes *iorA* et *iorB* ont été présentés dans le CHAPITRE 3 car ils sont localisés de manière adjacente au cluster de gènes responsables de la synthèse de malléobactine, suggérant un rôle dans les modifications chimiques (décoration) du sidérophore. La protéine IorA de PMB3(1) présente 83.23 % d'identité avec une protéine qui lie un centre fer/soufre (2Fe-2S) de *Glaciimonas immobilis*. L'analyse Pfam de la protéine a révélé la présence de deux domaines liant un centre fer/soufre (position 72-145 aa ; e-value $1.7e^{-27}$ et position 4-69 ; e-value $8.0e^{-07}$). Ce type de protéine appartient aux ferredoxines qui agissent comme accepteur/donneur d'électrons lors des réactions d'oxydoréduction. La protéine IorB possède 81.74 % d'identité avec une xanthine déshydrogénase fixant la molybdoptérine de *Glaciimonas sp.* PCH181. Plus largement, cette enzyme appartient à la famille des aldéhydes déshydrogénases. L'analyse Pfam de la protéine IorB a identifié 3 domaines « molybdopterin-binding domain of aldehyde dehydrogenase » aux positions 19-236, 342-642 et 636-729 aa dont la e-value est respectivement, $1.4e^{-12}$, $1.5e^{-31}$, $1.1e^{-11}$. Les aldéhydes déshydrogénases représentent une famille d'enzymes caractérisée par la capacité à lier le fer et avoir une activité oxydoréductase notamment l'oxydation d'un groupe aldéhyde (R-C(=O)-H) pour former un groupe carboxyle (R-C(=O)-O-H). La sous-unité IorA pourrait donc représenter l'accepteur/donneur d'électrons nécessaire à l'activité oxydoréductase de la seconde sous-unité IorB. Ces deux sous-unités formant une enzyme fonctionnelle, pourraient être responsables de certaines modifications chimiques de la malléobactine. Pour tester cette hypothèse, j'ai réalisé un mutant ciblé $\Delta iorB$ par insertion d'une cassette

de résistance à la gentamycine (CHAPITRE 3). L'analyse phénotypique de ce mutant sur le milieu CAS n'a pas mis en évidence de différences significatives avec la souche sauvage (mesure de halo sur milieu CAS). L'évaluation de la masse du sidérophore par ESI-MS n'a pas permis d'observer de différences avec la malléobactine de la souche sauvage. Ce résultat suggère donc que les gènes *iorAB* ne sont pas impliqués dans la biosynthèse de malléobactine.

- La protéine YedY. Le système YedYZ correspond à une sulfite oxydase membranaire décrite pour des réactions d'oxydation du molybdène chez *E. coli* (Brokx *et al.*, 2005). Son rôle a été discuté par Butt *et al.* qui propose que YedZY pourrait être impliqué dans la fixation et l'oxydation du fer (Butt and Thomas, 2017). Aucune démonstration expérimentale n'a permis de confirmer ou infirmer un rôle quelconque de ces gènes dans la capacité à altérer les minéraux de la souche PMB3(1). Néanmoins, étant donné que les résultats du CHAPITRE 5 suggèrent que la souche PMB3(1) est capable d'adhérer à la surface des minéraux, ce système YedYZ membranaire pourrait permettre l'oxydation du fer à la surface des minéraux (pure hypothèse). Cette oxydation pourrait alors entraîner des modifications de structures du minéral menant à sa dissolution.
- D'autres protéines pourraient potentiellement avoir un rôle direct ou indirect dans l'altération des minéraux. On peut citer deux protéines liées à l'adhésion (une protéine de synthèse de fimbriae et une adhésine) (voir §2.5), des protéines de biogénèse de cytochrome (SorA, SoxH), d'oxydoréduction ou d'hydrolyse du phosphate organique. En effet, quatre protéines de la famille des phosphatases ont été identifiées. Bien que ces enzymes soient décrites dans l'utilisation du phosphate organique (Margalef *et al.*, 2017), elles pourraient potentiellement jouer un rôle dans la solubilisation du phosphate inorganique (Rao *et al.*, 2000). Chhabra *et al.* ont démontré que les gènes du régulon Pho augmentaient significativement la capacité de *E. coli* à solubiliser le phosphate inorganique, mais le mécanisme n'a pas été démontré (Chhabra *et al.*, 2013). Ce régulon est impliqué dans la régulation du transport du phosphate et de l'activité des phosphatases mobilisatrices du phosphate d'origine organique (Lidbury *et al.*, 2016).

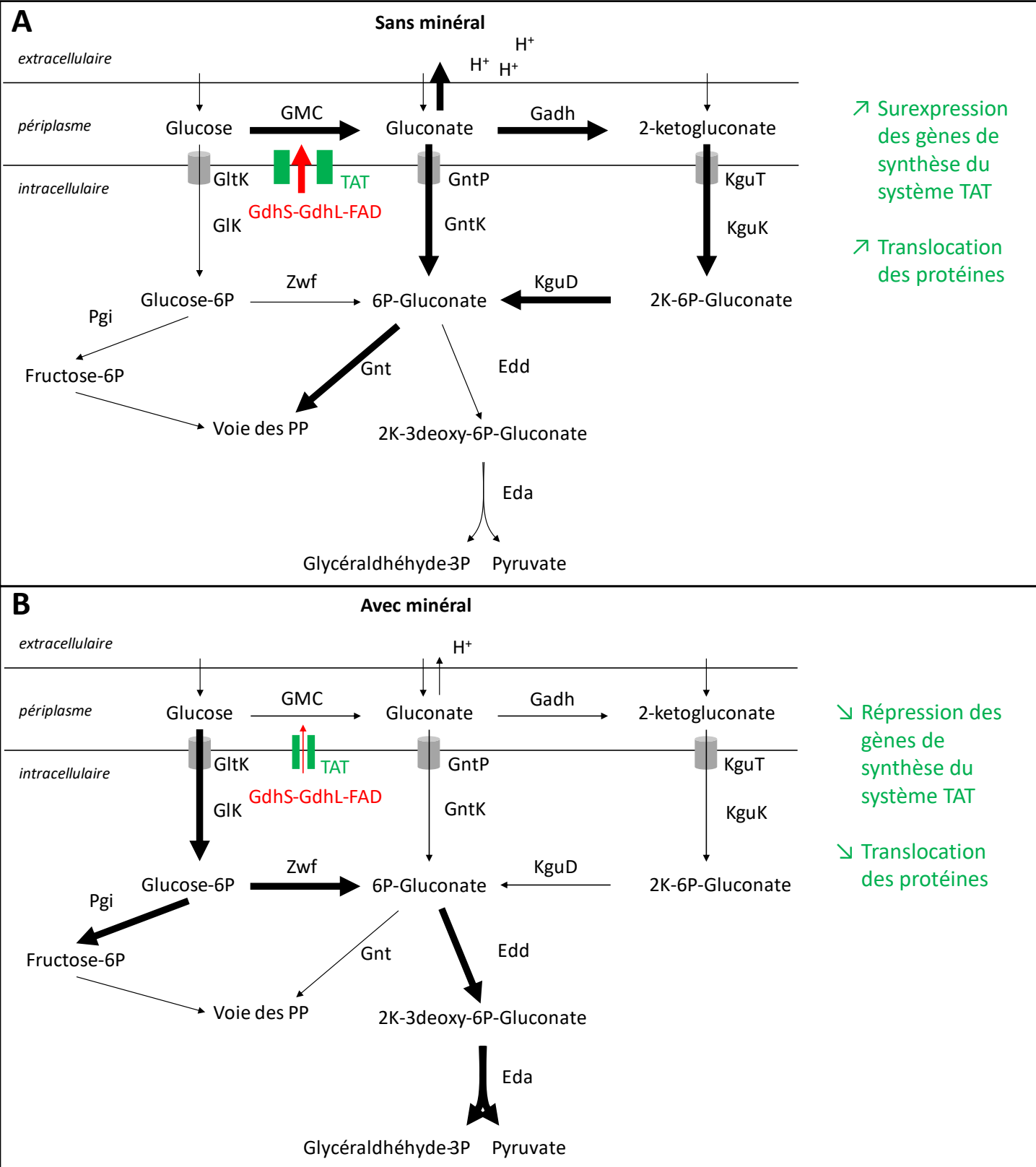


Figure 6.6 : Proposition de la régulation des enzymes liées aux voies métaboliques du glucose de la souche PMB3(1) en fonction de l'absence/présence du minéral, lien avec l'acidolyse (inspiré de Daddaoua *et al.*, 2007, 2010) et prise en compte de la régulation du système TAT

Eda : 2-keto-3-deoxy gluconate aldolase
 Edd : Phosphogluconate déshydrogénase
 Gadh : Gluconate déshydrogénase
 GIK : Glucokinase
 GltK : Glucose transporter
 GMC : Glucose/méthanol/choline oxydoréductase
 Gnt : 6-phosphogluconate dehydrogenase

GntK : Gluconokinase
 GntP : Gluconate permease
 KguD : 2-ketogluconate reductase
 KguK : 2-ketogluconate kinase
 KguT : 2-ketogluconate transporter
 Pgi : Glucose-6-phosphate isomérase
 Zwf : Glucose 6-phosphate 1-déshydrogénase

2.4.2. La régulation du système TAT et ses conséquences

Les données issues du CHAPITRE 5 suggèrent que les gènes responsables de la synthèse du système TAT sont différentiellement exprimés en fonction de la présence/absence du minéral. Notamment, les gènes *tatA* et *tatB* sont surexprimés en absence du minéral suggérant un mécanisme spécifique de l'absence du minéral. Etant donné que les protéines-TAT ont besoin de ce système de transport pour atteindre leur localisation finale, la régulation du système TAT pourrait entraîner indirectement un dysfonctionnement de leur activité.

La régulation du système TAT pourrait alors expliquer la régulation de l'activité de la GMC oxydoréductase et/ou de l'acide gluconique mesuré dans la solution. D'après les résultats obtenus, la GMC oxydoréductase semble être exprimée de manière basale par la souche PMB3(1) dans les conditions testées (une faible surexpression est observée en transcriptomique en condition de carence de la sous-unité GdhS). Le transport des sous-unités GdhS-GdhL-FAD (voir CHAPITRE 2), est néanmoins dépendant du système TAT. Dans ce contexte, lorsque le système TAT est fortement exprimé, le transport du complexe GdhS-GdhL-FAD vers sa localisation membranaire est accentué permettant ainsi théoriquement une activité plus importante de la GMC. A l'inverse, lorsque le système TAT est réprimé, les sous-unités GdhS-GdhL-FAD ne peuvent pas atteindre leur localisation périplasmique, la GMC oxydoréductase reste donc immature (car non liée à la troisième sous-unité GdhC), son activité est alors impossible.

Le système TAT étant surexprimé en absence de minéral, la GMC a une activité plus importante en absence de minéral, ce qui va dans le sens des autres protéines impliquées dans l'oxydation directe du glucose qui sont elles aussi surexprimées en absence de minéral (Figure 6.6). En absence du minéral, les bactéries sont en condition de carence et pourraient donc exprimer des mécanismes leur permettant d'acquérir les nutriments comme l'activité de la GMC.

2.5. Interaction étroite entre *Collimonas pratensis* PMB3(1) et le minéral

L'observation de minéraux et roches provenant de différents environnements (monuments, sols, aquifères) a permis de montrer que les microorganismes (champignons, bactéries...) peuvent former des biofilms à leur surface (Gorbushina and Broughton, 2009; Bellenberg *et al.*, 2018; Stranghoener *et al.*, 2018). La formation de telles structures (*i.e.*, biofilms) nécessite un contact direct et sur la durée entre microorganismes et minéral. Ce contact pourrait favoriser notamment les mécanismes d'altération des minéraux. Ahmed *et al.* ont réalisé des expériences d'altération

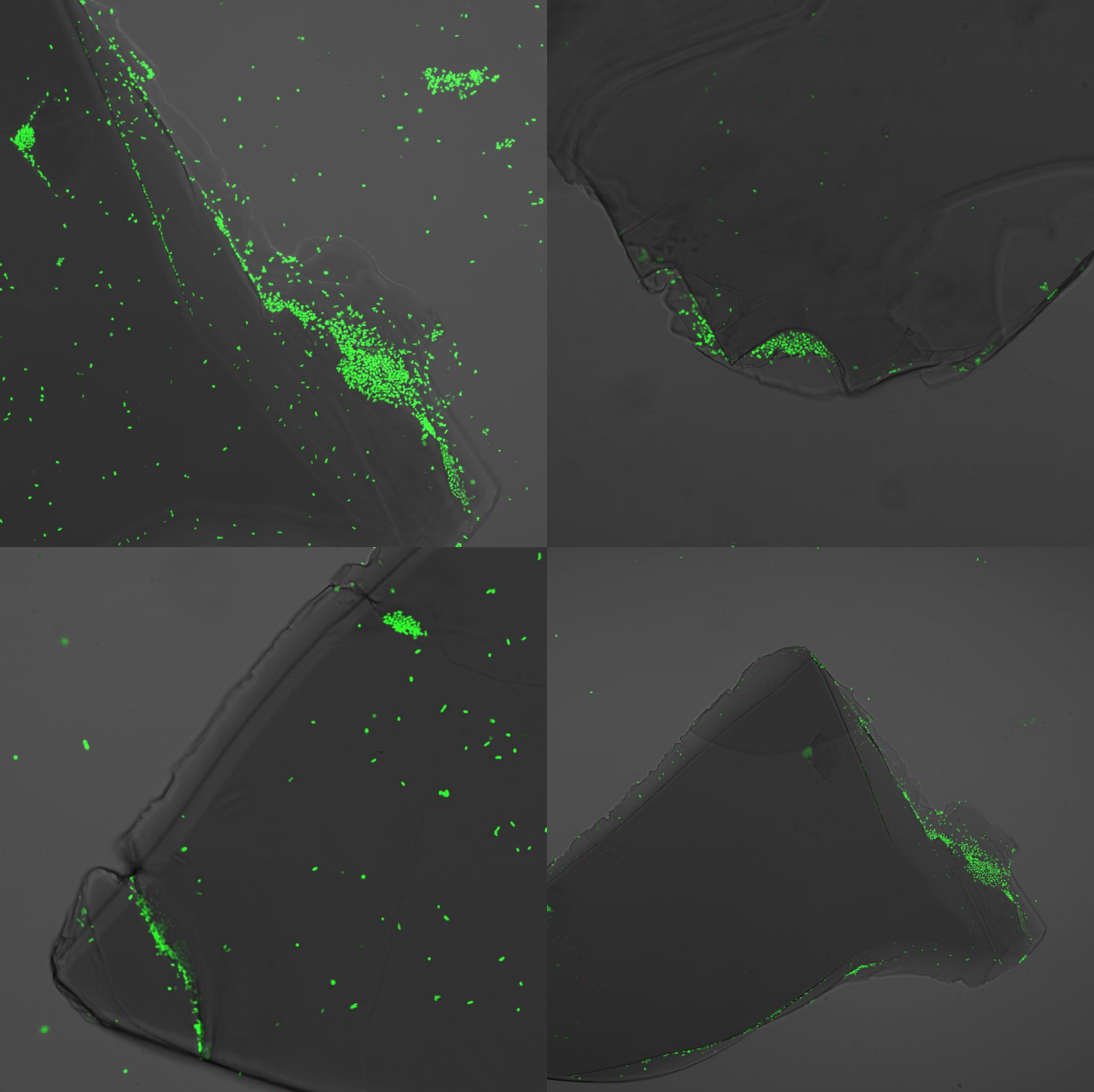


Figure 6.7 : Microscopie confocal d'une particule de biotite après incubation dans le milieu BHm glucose inoculé avec PMB3(1) pendant 7 jours (objectif x40 ; coloration au Syto9)

de biotite avec ou sans membrane permettant de séparer bactéries et minéraux. Ils ont montré qu'en présence d'une membrane empêchant le contact physique avec les minéraux, les souches de *Pseudomonas stutzeri*, *Pseudomonas mendocina*, *Neurospora crassa* et *Erwinia amylovora* étaient tout de même capables d'altérer la biotite. Néanmoins, l'altération de la biotite était plus importante lorsque les bactéries étaient en contact direct avec le minéral (Ahmed and Holmström, 2015). L'altération des minéraux par les bactéries ne nécessite donc pas obligatoirement un contact direct et permanent entre bactéries et minéral mais ce contact pourrait favoriser l'efficacité des mécanismes de l'altération des minéraux.

En ce qui concerne la souche PML1(12), les observations réalisées au microscope à épifluorescence de particules de biotite incubées dans les mêmes conditions expérimentales n'ont pas permis d'observer de bactéries créant des liaisons fortes avec la biotite. On suppose donc que la souche PML1(12) établirait plutôt une interaction plus faible avec le minéral *via* des forces de van der Waals. Au contraire, la présence de cellules bactériennes de la souche PMB3(1) après incubation avec de la biotite suggère des interactions plus fortes (Figure 6.7), indiquant que cette souche synthétise des molécules lui permettant d'adhérer à la surface du minéral.

Si aucune démonstration expérimentale n'a été faite, le CHAPITRE 5 a notamment mis en évidence que la souche PMB3(1) surexprimait des gènes de synthèse d'adhésines, de fimbriae et de phospholipides membranaires en présence de minéral. Les adhésines représentent une large famille de protéines qui permet aux cellules bactériennes de se fixer à une surface. Elles sont notamment étudiées dans le domaine biomédical car elles représentent un facteur de virulence pour de nombreuses bactéries (adhésions aux cellules hôtes...) (Klemm and Schembri, 2000). En ce qui concerne le rôle des adhésines dans l'altération des minéraux, une étude récente sur la souche de *Pseudomonas azotoformans* F77 a eu pour but d'étudier différents gènes cibles potentiellement impliqués dans l'altération des minéraux (Wang *et al.*, 2020). Entre autres, les auteurs ont ciblé un gène de synthèse d'adhésine et ont créé un mutant de délétion Δadh . La comparaison entre la souche sauvage et le mutant a révélé que le mutant Δadh présentait une réduction d'environ 20 % dans sa capacité à libérer les éléments chimiques à partir de biotite par rapport à la souche sauvage (Wang *et al.*, 2020). En ce qui concerne les phospholipides membranaires, ils pourraient jouer un rôle dans la fluidité membranaire illustrant la recherche d'adhésion de la bactérie sur la surface des minéraux ou une adaptation aux conditions de milieu (pression osmotique).

Le rôle de ces mécanismes dans la capacité à altérer de la souche PMB3(1) reste hypothétique et les mécanismes moléculaires découverts pendant ma thèse ne semblent pas nécessiter de contact direct entre la bactérie et le minéral. En effet, l'activité de la GMC oxydoréductase produit des protons dans le milieu extérieur et les sidérophores sont excrétés vers le milieu extérieur. Un contact direct entre bactérie et minéral pourrait permettre seulement une accélération de l'altération des minéraux. Néanmoins, d'autres mécanismes moléculaires ont besoin d'un contact direct comme les mécanismes d'oxydoréduction. Ils n'ont pas encore été découverts pour la souche PMB3(1) et pourraient faire l'objet de futures recherches.

2.6. Les minéraux, un habitat pour les bactéries mais pas que...

Les minéraux ont longtemps été considérés comme des surfaces inertes du sol servant principalement d'habitat pour les microorganismes comme l'attestent certaines images de « hutte » de bactéries sur des argiles (Lunsdorf *et al.*, 2000).

Néanmoins, il a été montré que les minéraux pouvaient influencer les communautés bactériennes présentes à leur surface par leurs propriétés intrinsèques. Par exemple, Colin *et al.* ont montré des modifications des communautés bactériennes en fonction de la présence de calcite, obsidienne et apatite après avoir été incubées pendant 2.5 années dans le sol et ce, sous trois essences d'arbres (hêtre, taillis et pin) (Colin *et al.*, 2017a). De plus, il a été montré que la colonisation des Actinomycètes était plus importante sur les granites ayant une forte porosité (Abdulla, 2009). Certini *et al.* ont également montré que les fractions minérales les plus fines étaient les plus colonisées (Certini *et al.*, 2004). De plus, l'incubation de bactéries sur différents minéraux (biotite, feldspaths, plagioclase) a révélé que les bactéries colonisaient de manière préférentielle les zones de clivage et les bords des minéraux (Barker *et al.*, 1998). Ensemble, ces résultats *in situ* ou au laboratoire suggèrent que les minéraux ont une influence sur leur colonisation par les bactéries notamment *via* leur taille, leur porosité et leur composition chimique. Ces découvertes ont mené à la proposition du concept de minéralosphère qui est la zone du sol sous l'influence des minéraux (Uroz *et al.*, 2015).

Malgré la grande diversité de minéraux, mes résultats présentés dans le CHAPITRE 4 démontrent que les bactéries sont capables d'altérer plusieurs types de minéraux. De plus, j'ai pu montrer que cette altération est dépendante de l'altérabilité du minéral, c'est-à-dire, les minéraux les plus altérables sont les minéraux les plus altérés par les bactéries. Cette conclusion semble

évidente et pourtant, les bactéries peuvent former des biofilms autour des minéraux diminuant leur altération (Lüttge and Conrad, 2004).

D'autre part, j'ai pu montrer dans le CHAPITRE 4 que les mêmes mécanismes moléculaires étaient employés par les bactéries pour altérer les minéraux quel que soit le type de minéral suggérant que ces mécanismes ne sont pas spécifiques.

Néanmoins, ces conclusions sont à nuancer car les minéraux testés dans le CHAPITRE 4 sont tous des minéraux contenant dans leur structure des cations nutritifs. Qu'en est-il des minéraux contenant des éléments toxiques comme le plomb ou l'arsenic ? Les mécanismes moléculaires impliqués dans l'altération de minéraux toxiques sont-ils tout de même exprimés par les bactéries ? Il serait alors intéressant d'étudier l'altération des minéraux lorsque les bactéries sont en présence de différents types de minéraux. La dépendance de l'altérabilité des minéraux est-elle toujours valide lorsque les bactéries sont en présence d'un minéral contenant des éléments nutritifs et d'un minéral toxique ou y a-t-il une altération préférentielle pour un type de minéral ? Toutes ces questions pourront faire l'objet de nouvelles recherches.

2.7. Les résultats obtenus peuvent-ils être élargis au genre *Collimonas* ?

Comme présenté dans l'introduction de ma thèse, le genre *Collimonas* a été étudié pour différentes fonctions comme la mycophagie ou l'altération des minéraux. En ce qui concerne cette dernière fonction, des expériences de caractérisation phénotypique de différentes collections avaient été réalisées. Dans le CHAPITRE 1, j'ai présenté l'étude de Uroz *et al.* qui avait pour but d'évaluer la capacité à altérer les minéraux de 45 souches de *Collimonas* (Uroz *et al.*, 2009b). Il s'est avéré que l'altération des minéraux était un trait fonctionnel de ce genre bactérien. Cependant, il semblerait qu'il y ait des disparités en termes d'efficacité en fonction de l'espèce et de l'origine. Les souches de *Collimonas* originaires de la toundra arctique sont notamment moins efficaces pour altérer la biotite par rapport aux souches provenant des sols forestiers acides et des dunes. Ces différences pourraient potentiellement s'expliquer par des variations génétiques.

Au début de ma thèse, aucun déterminant génétique de l'altération des minéraux n'avait été identifié pour le genre bactérien *Collimonas*. Mela *et al.* étaient les seuls à avoir souligné la présence d'un gène codant une potentielle quinoprotéine lors de la comparaison des génomes de 5 souches de *Collimonas* (Mela *et al.*, 2012). L'implication de cette possible quinoprotéine dans la capacité à altérer était basée sur le fait que l'enzyme la plus décrite dans l'altération des

PhyML ln(L)=-4636.0 1550 sites GTR 100 replic. 4 rate classes

0.02

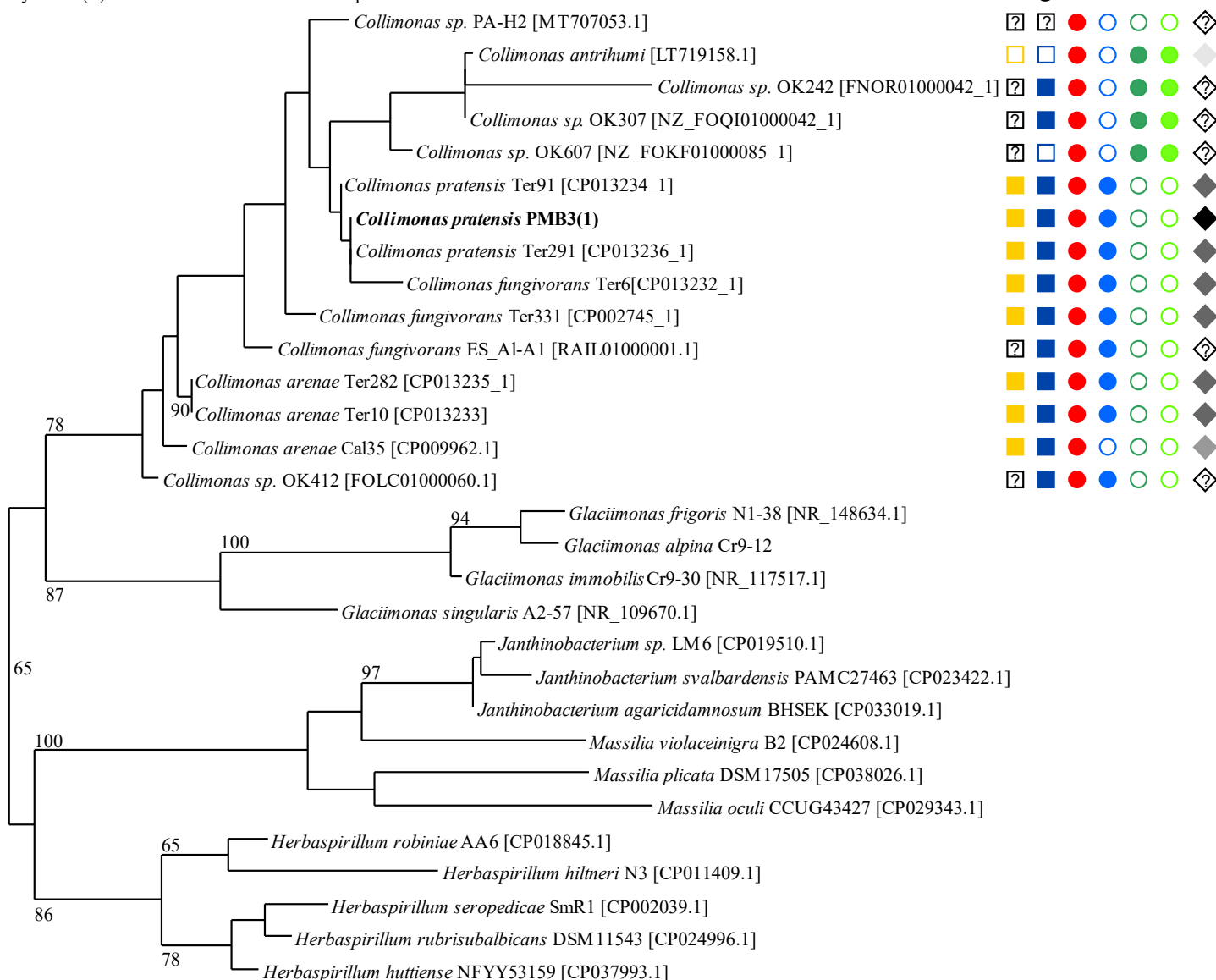


Figure 6.8 : Arbre phylogénétique des séquences du gène codant l'ARNr 16S du genre *Collimonas* et genres voisins et mien avec la fonction d'altération des minéraux

Les phénotypes des *Collimonas* sont présentés par des carrés (i) jaunes pour la capacité à solubiliser le phosphate à partir de phosphate tricalcique (TCP) ou (ii) bleus pour la capacité à mobiliser le fer complexé au chromazurol S (CAS). Les ronds représentent le génotype des souches considérées. Les ronds rouges indiquent la présence (pleins) ou absence (vides) des gènes codant la GMC oxydoréductase, les ronds bleus indiquent la présence (pleins) ou absence (vides) du cluster de gènes codant la malleobactine, les ronds verts foncés indiquent la présence (pleins) ou absence (vides) d'une GDH PQQ dépendante et les ronds verts clairs indiquent la présence (pleins) ou absence (vides) des gènes de synthèse de PQQ (*pqqABCD*). Les losanges présentent l'origine des différentes souches chaque nuance de gris correspondant à une localisation différente : gris très clair : grotte en Chine, gris clair : forêt en Californie, gris foncé : dunes en Hollande, noir : forêt acide en France.

Lorsque les données ne sont pas accessibles, un point d'interrogation est représenté.

Les numéros d'accessions NCBI sont présentés entre crochets.

minéraux était une glucose déshydrogénase PQQ-dépendante (*i.e.*, quinoprotéine). Néanmoins, l'analyse BLASTP (NCBI) réalisée sur la séquence protéique de cette quinoprotéine durant ma thèse n'a pas révélé d'homologie de séquence avec une GDH-PQQ. De plus, aucun gène de synthèse du cofacteur PQQ n'a été retrouvé dans les génomes des souches de *Collimonas* testées dont la souche PMB3(1).

Pour découvrir si tous les *Collimonas* utilisent des mécanismes d'altération des minéraux similaires à ceux découverts dans ma thèse, je me suis concentrée sur les gènes responsables de la synthèse de la GMC, de GDH-PQQ, du cofacteur PQQ et ceux liés à la synthèse de malléobactine. Pour réaliser ce travail, j'ai considéré les génomes de *Collimonas* séquencés et disponibles dans les bases de données, soit un total de 15 souches de *Collimonas* (Figure 6.8)

Toutes les souches correspondantes se sont avérées posséder une GMC oxydoréductase, soulignant la conservation de cette enzyme au sein du genre. D'après l'analyse phylogénétique réalisée sur la séquence protéique de la large sous-unité (GdhL), les GMC oxydoréductases des *Collimonas* testés auraient probablement toute une activité glucose déshydrogénase (CHAPITRE 2 §3 Figure S3). Il semblerait donc que les souches de *Collimonas* séquencées à ce jour pourraient altérer les minéraux *via* l'action d'une GMC oxydoréductase. Néanmoins, l'analyse de génomes récemment libérés dans les bases de données montre que 4 souches de *Collimonas* (*Collimonas antrihumi*, *Collimonas sp.* OK242, *Collimonas sp.* OK307, *Collimonas sp.* OK607) possèdent en plus d'un homologue de GMC oxydoréductase, une alcool déshydrogénase PQQ-dépendante (possiblement une GDH-PQQ) ainsi que les gènes de synthèse de PQQ (*i.e.*, *pqqABCDE*). La présence à la fois de GMC oxydoréductase et de ADH-PQQ pour 4 souches de *Collimonas* rappelle la souche *Caballeronia mineralivorans* PML1(12) qui possède également ces deux types d'enzymes et qui pourtant semble altérer les minéraux uniquement *via* sa GMC oxydoréductase.

En ce qui concerne les gènes impliqués dans la synthèse de malléobactine, le cluster de gènes de synthèse a été retrouvé pour 9 souches sur 15. Les souches ne possédant pas ce cluster sont *Collimonas antrihumi*, *Collimonas sp.* OK242, *Collimonas sp.* OK307, *Collimonas sp.* OK607, *Collimonas sp.* PA-H2 et *Collimonas arenae* Cal35. D'après l'analyse du génome par AntiSMASH, les souches *Collimonas sp.* OK242, *Collimonas sp.* OK307 et *Collimonas arenae* Cal35 présenteraient un autre système de synthèse de sidérophore. La souche Cal35 présenterait un cluster de gènes correspondant à la synthèse de myxochéline (45 % d'identité d'après AntiSMASH) et les souches OK242 et OK307 pourraient potentiellement synthétiser une

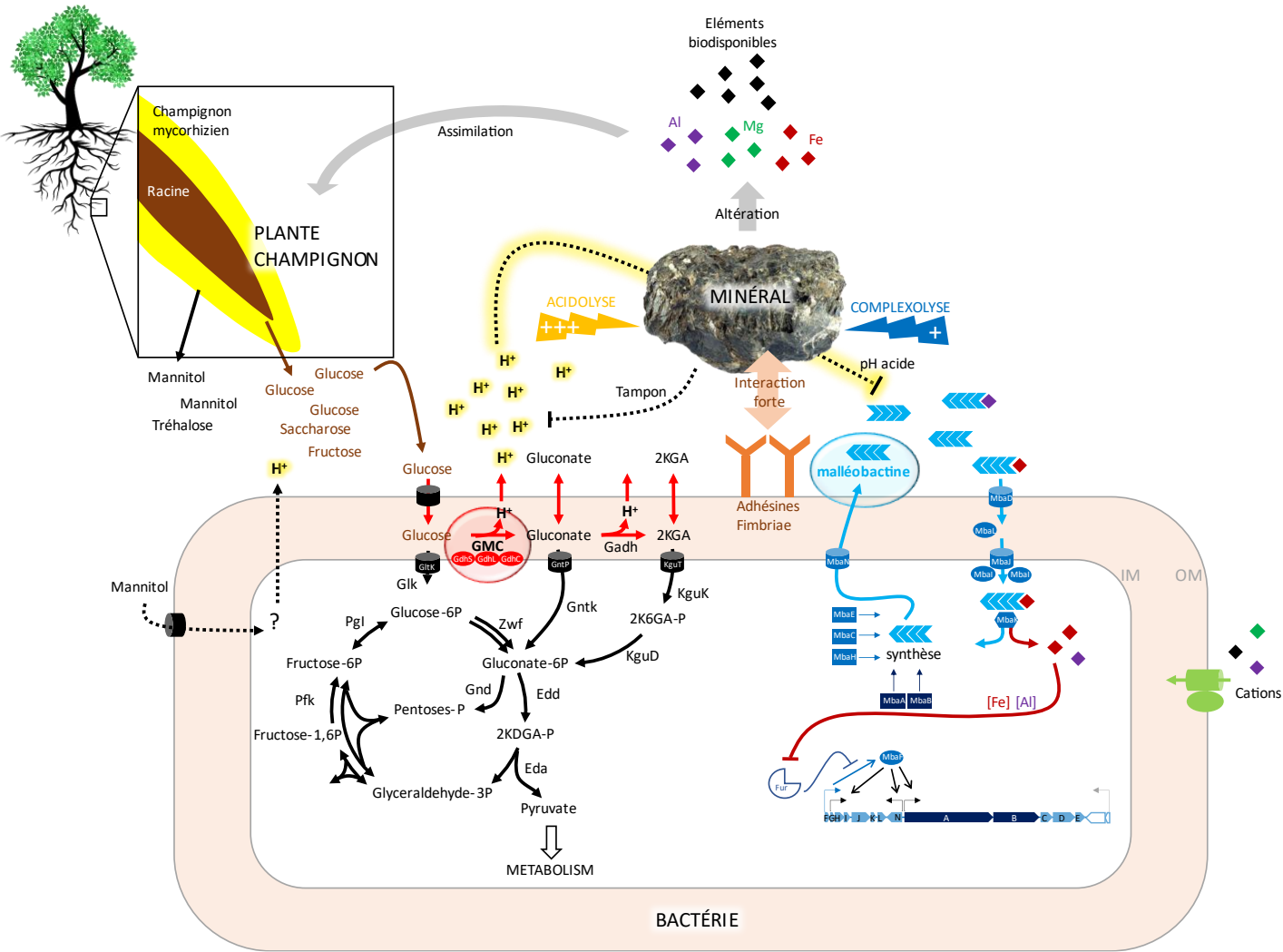


Figure 6.9 : Proposition d'un schéma général illustrant les interactions entre plantes, bactéries et minéral en lien avec l'altération des minéraux

Les flèches en pointillées indiquent des suppositions tandis que les traits pleins ont été démontrés dans la littérature ou dans mes travaux de thèse.

Les flèches terminées par un trait indiquent une inhibition.

staphylobactine (18 % d'identité d'après AntiSMASH). Ces résultats sont en accord avec les tests phénotypiques qui démontrent que les souches *Collimonas sp.* OK242, *Collimonas sp.* OK307 et *Collimonas sp.* PA-H2 sont tout de même positives sur le milieu CAS. Les souches *Collimonas antrihumi* et *Collimonas sp.* OK607 sont au contraire négatives.

En conclusion, les systèmes impliqués dans l'altération des minéraux et identifiés dans ma thèse (GMC et malléobactine) semblent relativement bien conservés au sein du genre *Collimonas*. Néanmoins, 6 souches sur 15 présentent d'autres systèmes potentiellement impliqués dans l'altération des minéraux comme une ADH-PQQ (pour 4 souches) et d'autres sidérophores (pour 3 souches).

Pour avoir une vision plus globale de la conservation des mécanismes identifiés au niveau du genre *Collimonas*, il serait nécessaire d'étudier un plus grand nombre de génomes. Dans le cadre des recherches de Stéphane Uroz, un total de 58 génomes de *Collimonas* a été séquencé. Une étude de génomique comparative sur la base de ces génomes est en cours.

2.8. Remise dans un contexte écologique

La synthèse des résultats de ma thèse positionnés dans un contexte écologique est présentée dans la figure 6.9.

Dans le sol, les racines des plantes sont en symbiose avec des champignons mycorhiziens. Ces champignons fournissent également du carbone dans le sol. Ainsi, dans l'environnement mycorhizosphérique différentes sources de carbone sont retrouvées provenant des exsudats racinaires (glucose, saccharose, fructose...) ou des champignons (tréhalose, mannitol...). Ces sources influencent directement les mécanismes moléculaires de l'altération des minéraux mis en place par les bactéries. En l'occurrence, le glucose mène à une forte acidification *via* l'activité d'une glucose déshydrogénase périplasmique (GDH-PQQ ou GMC oxydoréductase). A l'inverse, en présence de mannitol, l'acidification est beaucoup moins importante. Si les gènes et protéines impliqués dans l'altération des minéraux en présence d'autres sucres sont encore inconnus, on peut supposer que les polysaccharides contenant du glucose (saccharose, tréhalose...) pourraient également impliquer la GDH de la voie OD. Néanmoins, à ma connaissance, les premières étapes du métabolisme du saccharose ou du tréhalose n'impliquent pas la voie d'oxydation directe du glucose, mais leur transformation en glucose peut se tenir

dans le périplasme et conduire à une utilisation partielle de la voie OD (Reid and Abratt, 2005; Ruhel *et al.*, 2013; Vanaporn and Titball, 2020).

Ainsi, en modulant la composition de leurs exsudats racinaires, les plantes pourraient influencer directement les activités (ex : capacité à altérer les minéraux) des bactéries en fonction de leur besoin nutritif. Il est donc possible d'imaginer qu'une plante en carence d'éléments inorganiques (Fe, K, Mg...) sécrète des exsudats racinaires composés majoritairement de glucose ce qui permettra aux bactéries rhizosphériques d'altérer les minéraux efficacement et donc de subvenir aux besoins des plantes. Dans ce sens, une étude a pu montrer que des plants de maïs sécrétaient significativement plus de glucose en carence de fer (Carvalhais *et al.*, 2011).

En fonction de la source de carbone disponible, l'efficacité à altérer les minéraux par les bactéries peut fortement varier et conduire à une altération plus ou moins forte des minéraux. Il est important de noter que lors de leur altération, les minéraux captent des protons. Ils jouent donc un rôle équivalent à celui d'un tampon. La production d'agent altérant doit donc être conséquente. Dans le cas d'un milieu tamponné ou d'un minéral tamponnant le milieu (ex : carbonate), l'acidolyse peut être neutralisée et d'autres mécanismes d'altération des minéraux sont mis en place par les bactéries. C'est notamment dans ces conditions que les bactéries développent des stratégies de production de sidérophores. Le mécanisme de complexolyse, moins efficace (en absolu) que l'acidolyse permet tout de même d'altérer les minéraux dans des conditions particulières (*i.e.*, tampon fort).

En plus de ces deux mécanismes, certaines bactéries semblent capables d'adhérer à la surface des minéraux. L'adhésion pourrait être une stratégie développée par les bactéries pour (i) agir localement et (ii) plus efficacement sur le minéral et (iii) potentiellement développer d'autres mécanismes d'altération comme les réactions d'oxydoréduction.

Les minéraux altérés par acidolyse et/ou complexolyse libèrent leur contenu chimique en solution. Si les éléments chimiques sont des nutriments, ils peuvent être assimilés grâce à différents systèmes de transport par les bactéries ou les autres organismes vivants (ex : plantes, champignons). A l'inverse, certains éléments chimiques toxiques libérés par les minéraux peuvent induire une situation de stress pour les organismes vivants. De manière générale, la disponibilité en éléments nutritifs provenant du minéral ou non entraînent de fortes régulations de l'expression des gènes chez les bactéries. Ainsi, l'interaction entre bactéries et minéraux pourrait être considérée comme un cycle de réactions moléculaires et chimiques ; d'un côté les bactéries en situation de carence enclenchent des mécanismes moléculaires qui altèrent les

minéraux, en réponse, les minéraux libèrent leur contenu chimique, ces modifications chimiques sont perçues par les bactéries qui adaptent leurs mécanismes en conséquence...

Pour finir, d'autres gènes et protéines sont impliquées dans l'altération des minéraux comme l'atteste le double mutant 25(10F) Δ NRPS (impacté dans la synthèse de GMC et malléobactine) qui est toujours capable d'altérer les minéraux, même si beaucoup plus faiblement que la souche sauvage (sauf dans le milieu BHm mannitol).

3. Critiques des approches

Dans ma thèse, plusieurs choix ont été faits qui sont critiquables et qui peuvent limiter la portée des résultats obtenus. A titre d'exemple, j'ai choisi de faire une banque de mutants aléatoires par l'insertion d'un plasposon pOT-182 en criblant environ 3000 mutants. Si l'on considère que l'insertion du plasposon se fait pour chaque mutant sur un gène différent, que la taille d'un gène fait en moyenne 1 kb et que la taille du génome de PMB3(1) fait environ 6 Mb, il aurait fallu faire une banque d'au moins 6000 mutants pour avoir une couverture complète du génome de PMB3(1). Il est donc envisageable que d'autres gènes liés à l'altération des minéraux n'aient pas été détectés par ce premier crible. Il pourrait être intéressant de compléter cette banque de mutants.

Le criblage des mutants a été réalisé sur différents biotests mimant l'altération des minéraux, tels que i) la solubilisation du phosphate sur TCP, ii) l'acidification du milieu et iii) la mobilisation du fer sur CAS. Tous ces biotests possèdent comme unique source de carbone le glucose. Ce choix est justifié par le fait que le glucose est une des principales sources de carbone retrouvée dans les sols forestiers et que son utilisation mène à une efficacité d'altération des minéraux importante par les bactéries comparativement à d'autres sucres. Cependant, dans le CHAPITRE 4, nous avons vu que les mécanismes moléculaires de l'altération des minéraux (*i.e.*, acidification et complexation) étaient modulés par la source de carbone du milieu de culture. L'utilisation unique du glucose dans les biotests de criblage de la banque de mutants peut donc être considéré comme un biais, c'est pourquoi je suggèrerais d'ajouter d'autres biotests avec d'autres sources de carbone tout en restant dans le contexte écologique de la souche considérée.

4. Perspectives

D'après les études sur les communautés de bactéries altérantes, il semble que les mécanismes moléculaires développés par les bactéries pour altérer les minéraux sont nombreux et différent en fonction de la souche bactérienne considérée et du contexte environnemental (*i.e.*, rhizosphère, mycorrhizosphère, sols acides, toundra arctique...). La génétique de l'altération des minéraux par les bactéries est encore peu étudiée, de même que notre compréhension des régulations des gènes et protéines impliqués. Nous n'en sommes qu'au début des découvertes liées aux gènes impliqués dans l'altération des minéraux par les bactéries. Ma thèse a apporté de nouvelles connaissances et pistes à des stades de compréhension plus ou moins avancés sur le sujet. Dans cette dernière partie, je propose différents points et expériences à approfondir.

4.1. Les sources de carbone, des pistes à approfondir

Cette thèse a permis de confirmer l'importance de la source de carbone dans les mécanismes d'altération des minéraux. Malgré le lien direct entre les enzymes du métabolisme et l'altération des minéraux par les bactéries, seules les enzymes impliquées dans le métabolisme du glucose ont été identifiées.

Pour découvrir d'autres enzymes potentiellement impliquées dans l'altération des minéraux, je propose plusieurs approches différentes.

La première serait une approche globale, sans *a priori* et en lien avec l'écologie de la bactérie étudiée. Je propose de cribler une banque de mutants (celle de PMB3(1) ou de PML1(12) par exemple) sur d'autres biotests : un milieu liquide non-tamponné (de type TCP sans phosphate tricalcique) mais qui contiendrait d'autres sources de carbone comme le mannitol, le tréhalose ou le saccharose... Le pH du milieu serait mesuré après 3 et/ou 7 jours d'incubation par le vert de bromocrésol, un indicateur coloré. Les mutants seraient alors sélectionnés pour leur incapacité à acidifier le milieu en présence de ces différentes sources de carbone (comparé à la souche sauvage).

Pour aller encore plus loin, on pourrait également proposer un milieu de culture possédant un mélange de plusieurs sources de carbone dont la composition mimerait celle d'exsudats racinaires sécrétés par un arbre en condition de carence. Il faudrait alors au préalable étudier les exsudats racinaires d'un arbre modèle (ex : le chêne) et identifier les carbohydrates produits lorsque le plant est en carence de nutriments inorganiques.

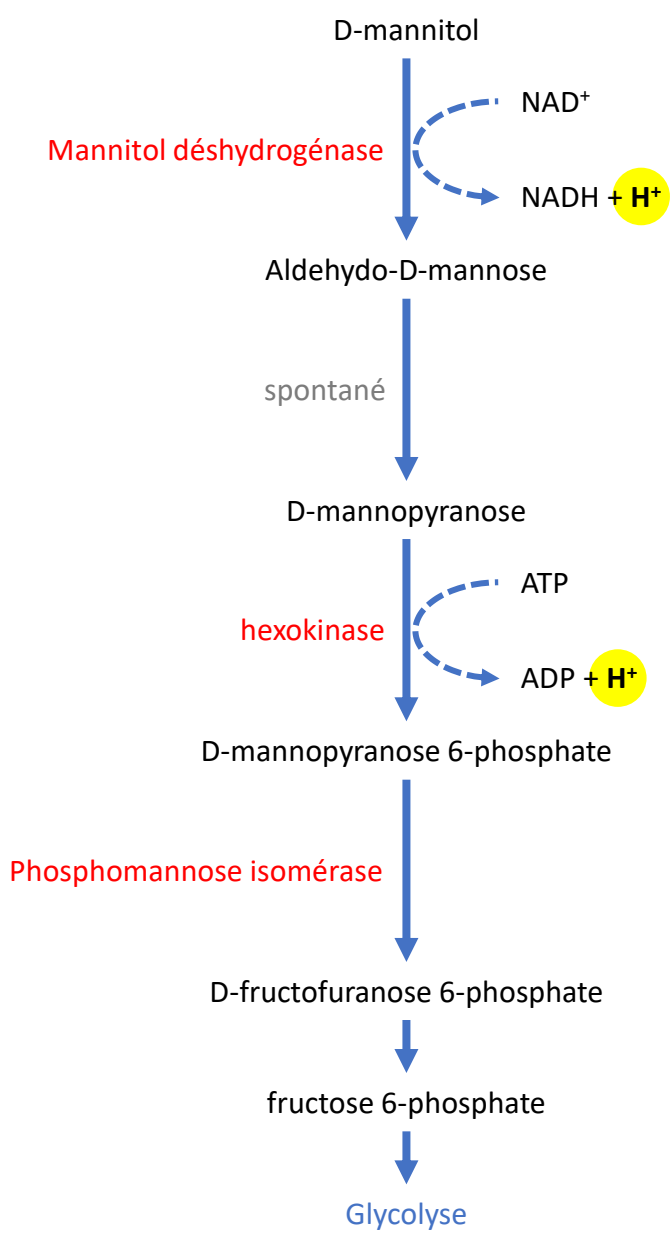


Figure 6.10 : Voie métabolique du mannitol

Dans un deuxième temps, une approche avec *a priori* pourrait être envisagée. Dans le CHAPITRE 4, j'ai pu montrer que la souche PMB3(1) et ses mutants 25(10F) et Δ NRPS sont toujours capables d'altérer les minéraux en présence de mannitol. La capacité résiduelle est-elle liée au fonctionnement de base de la cellule (ex : respiration) ou d'autres mécanismes particuliers impliquées dans l'altération des minéraux ? J'ai donc émis l'hypothèse qu'une enzyme liée au métabolisme du mannitol pouvait potentiellement libérer des protons *via* son activité et ainsi altérer les minéraux par acidolyse. Notamment, l'analyse du génome de PMB3(1) a permis d'identifier une mannitol déshydrogénase. La séquence protéique correspondante possède 36.79 % d'identité avec la mannitol déshydrogénase de *Pseudomonas fluorescens* DSM50106 [AAC04472.1] dont la fonction a été démontrée (Brünker *et al.*, 1997). L'analyse Pfam de la protéine identifiée indique la présence d'un domaine mannitol déshydrogénase C-terminal (position 203-445 aa ; e-value = $1.3e^{-71}$) et un domaine Rossmann mannitol déshydrogénase (position 13-74 aa ; e-value = $8.0e^{-33}$). Cette enzyme serait responsable de la conversion du mannitol en mannose, cette réaction est accompagnée de la production d'un proton H^+ (Figure 6.10) et nécessite le cofacteur $NAD^+/NADH$. Le mannose est ensuite converti par différentes étapes en fructose-6-phosphate pour rentrer dans la voie de la glycolyse. Cette enzyme pourrait donc potentiellement produire des protons par son activité et ainsi acidifier le milieu, menant à une acidolyse des minéraux. Néanmoins, d'après les analyses Psort, cette enzyme serait cytoplasmique ce qui pose question sur son implication dans l'altération des minéraux. La création d'un mutant mannitol déshydrogénase pourrait permettre de tester cette hypothèse.

Enfin, une analyse plus approfondie *in silico* des différentes voies métaboliques de la souche PMB3(1) liées à l'utilisation des sucres retrouvés dans la mycorrhizosphère pourrait permettre de trouver de nouveaux gènes candidats pour l'élaboration de mutants ciblés. Cette analyse pourra se focaliser dans un premier temps sur les enzymes périplasmiques permettant la production directe ou indirecte de protons.

4.2. Le sidérophore : un rôle dans l'altération au-delà de la complexation du fer

Dans la littérature, il a été montré que les sidérophores pouvaient avoir différentes fonctions autres que la chélation du fer (Johnstone and Nolan, 2015). Notamment, certains sidérophores peuvent complexer différents métaux (Callahan and Cook, 1984; Mehnert *et al.*, 2017; Patel *et al.*, 2018), des terres rares (Wehrmann *et al.*, 2019), voire même des macroéléments tels que le calcium ou le magnésium (Shenker *et al.*, 1996; Siebner-Freibach *et al.*, 2006; Bhattacharya,

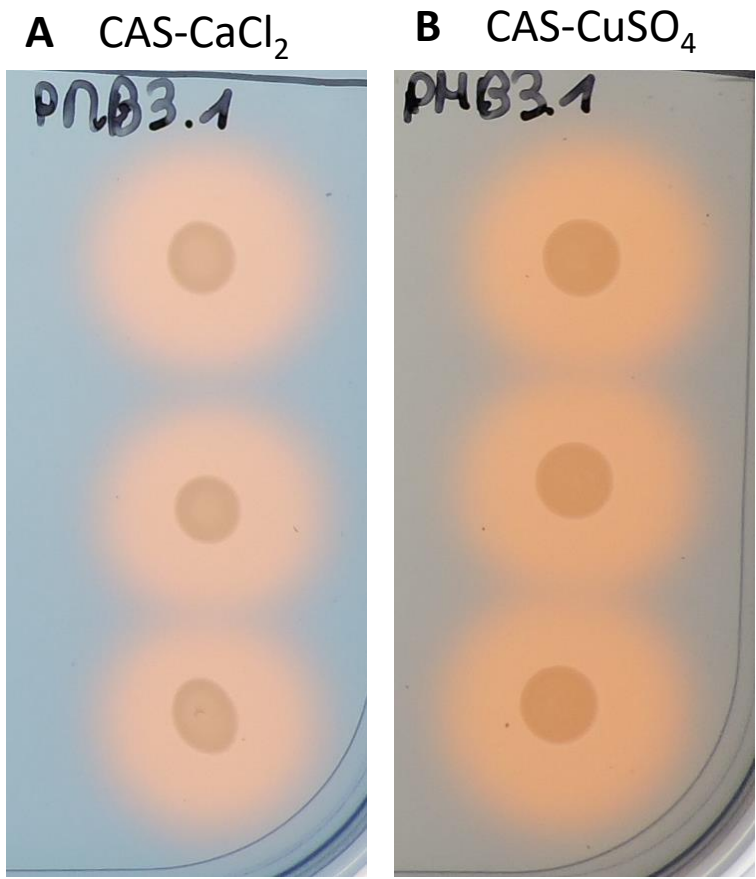


Figure 6.11 : Capacité de la souche PMB3(1) à chélater le calcium ou le cuivre

Dix microlitres de suspension bactérienne calibrée à DO = 0.9 a été inoculé sur le milieu CAS solide contenant soit 1 mM de CaCl₂ (A) soit 1 mM de CuSO₄ (B). Après 3 jours d'incubation à 25 °C, un halo orange est observé indiquant que la souche PMB3(1) est capable de chélater de calcium et le cuivre.

2011). Cependant, les études réalisées jusqu'à présent ont testé la capacité des sidérophores à complexer des ions déjà accessibles ou complexés à des agents tels que l'EDTA, mais aucune étude à ma connaissance n'a testé cette capacité sur des ions sous forme solide dans une structure minérale. Dans le contexte de ma thèse, c'est-à-dire l'acquisition de nutriments à partir de minéraux, il serait intéressant de découvrir si la malléobactine est capable de complexer des cations présents dans la composition chimique de minéraux autres que le fer. Cette découverte ouvrirait alors de nouvelles perspectives sur le rôle des sidérophores dans l'altération des minéraux.

Pour déterminer si la malléobactine est impliquée dans la chélation d'autres ions, quelques expériences préliminaires ont été réalisées sur le calcium et le cuivre avec la souche PMB3(1). Notamment, deux biotests composés du milieu CAS en absence de fer mais en présence de calcium ou de cuivre ont été réalisés (Patel *et al.*, 2018). Le chromazurol S forme alors un complexe avec l'ion présent (*i.e.*, calcium ou cuivre). Ce complexe de couleur bleu devient orange lorsqu'il est dissocié sous l'action d'un chélateur. Les résultats présentés dans la Figure 6.11 montrent que la souche PMB3(1) est capable de chélater le calcium et le cuivre. Pour réellement déterminer l'implication de la malléobactine dans cette chélation, le mutant Δ NRPS devra aussi être testé.

Pour découvrir l'implication de la malléobactine dans l'altération de minéraux ne contenant pas de fer, je me suis concentrée sur l'apatite. L'apatite est un minéral rapidement altérable composé majoritairement de phosphore et de calcium. C'est un minéral qui a donc un intérêt nutritionnel pour les plantes et les bactéries. La malléobactine étant capable de chélater le calcium, elle pourrait alors être impliquée dans l'altération de l'apatite.

Pour tester cette hypothèse, un test d'altération en présence d'apatite pourra être réalisé en testant les souches PMB3(1) sauvage et son mutant Δ NRPS impacté dans la production de sidérophores. Pour pouvoir mesurer l'altération de l'apatite, il faudra utiliser un milieu de culture dépourvu de phosphore et de calcium. La difficulté de cette expérience est alors de construire un milieu de culture sans phosphore. En effet, les tampons phosphate sont largement utilisés dans les milieux de culture. Ainsi, d'autres tampons devront être privilégiés comme le PIPES (acide pipérazine-N,N'-bis(2-éthanesulfonique)) ou le MES (acide 2-(N-morpholino)éthanosulfonique).

Tableau 6.1 : Design expérimental proposé pour évaluer l'effet PGPR de la souche PMB3(1) et l'implication de la GMC oxydoréductase dans cette fonction

Solution	Minéral (Biotite)	<i>Pinus sylvestris</i>	<i>Collimonas pratensis</i> PMB3(1)
-K-Mg	-	-	-
-K-Mg	+	-	-
-K-Mg	-	+	-
-K-Mg	+	+	-
-K-Mg	-	+	WT
-K-Mg	+	+	WT
-K-Mg	-	+	25(10F)
-K-Mg	+	+	25(10F)
+K+Mg	-	+	-
+K+Mg	-	+	WT

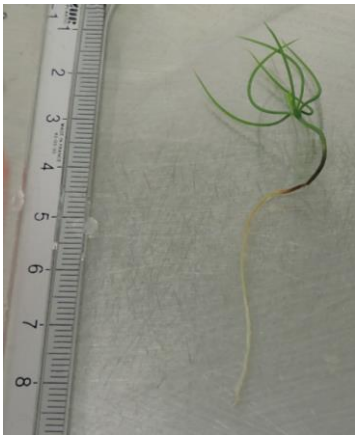
4.3. La capacité à promouvoir la croissance des plantes de la souche PMB3(1)

Les bactéries sont capables de promouvoir la croissance des plantes *via* différents mécanismes comme la production de phytohormones, la lutte contre les pathogènes... La fonction d'altération des minéraux par les bactéries est considérée comme une fonction PGPR car elle permet de rendre certains nutriments inorganiques biodisponibles pour les plantes (Vacheron *et al.*, 2013). Par exemple, l'inoculation ou la co-inoculation d'une souche efficace pour altérer les minéraux comme *Caballeronia mineralivorans* PML1(12) augmente la taille des parties aériennes, la biomasse, la longueur et la surface des racines du pin sylvestre par rapport aux plants non-inoculés (Calvaruso *et al.*, 2006). Cette fonction PGPR peut être considérée également pour la souche PMB3(1). En effet, Koele *et al.* 2009 ont révélé une augmentation significative de la biomasse du pin sylvestre en présence du champignon ectomychorizien *S. citrinum* et de la souche PMB3(1) par rapport aux plants non-inoculés, mais cet effet n'était pas observé lorsque la plante était en présence seulement de PMB3(1) (Koele *et al.*, 2009). Cependant, ces expériences réalisées en flux continu de solution nutritive n'ont peut-être pas permis le maintien de la souche PMB3(1) sans son partenaire fongique.

D'autre part, il est difficile de distinguer le rôle réel de l'altération des minéraux des autres fonctions (*i.e.*, production de phytohormones...) dans la capacité à promouvoir la croissance des plantes par les bactéries. En effet, les bactéries présentent souvent plusieurs fonctions capables d'améliorer la croissance des plantes. C'est le cas de la souche PMB3(1) qui, en plus d'altérer les minéraux, produit des molécules antifongiques (lutte contre les pathogènes) et des phytohormones (auxines). En prenant en compte cet aspect, il n'existe pas à l'heure actuelle d'études évaluant la capacité PGP *via* la dissolution des minéraux par une souche bactérienne altérante comparée à un mutant impacté dans sa capacité à altérer les minéraux.

Pour déterminer les propriétés PGPR de la souche PMB3(1) et évaluer l'implication de la GMC oxydoréductase dans cette fonction, je propose de réaliser l'expérience suivante :

Des plants de pin sylvestre (choisis pour leur vitesse de croissance et leur utilisation dans d'autres expériences similaires) seront stérilisés et inoculés avec la souche PMB3(1) ou son mutant 25(10F). Pour maintenir au mieux la souche bactérienne dans les pots de culture, un système stérile fermé sera utilisé. La plante devra être cultivée dans un substrat pauvre en nutriments inorganiques. Un substrat composé de perlite (billes de silice) dont la composition chimique devra être analysée et de biotite (seule source de K et Mg) sera mélangé à une solution nutritive carencée en certains éléments chimiques (*i.e.*, : K et Mg) et adaptée à la croissance de

A Jour de l'incubation**B** +K +Mg**C** -K -Mg +PMB3(1)**D** Solution nutritive :

NaH ₂ PO ₄ , 2H ₂ O	0.20 g
NO ₃ NH ₃	0.64 g
CaSO ₄ , H ₂ O	0.20 g
CuSO ₄ , 5H ₂ O	0.12 g
Mo	0.06 g
+/- KCl	0.18 g
+/- MgSO ₄	0.12 g

Figure 6.12 : Expériences préliminaires évaluant l'effet de carence sur la croissance du pin sylvestre

Après deux semaines de germination des pins sylvestre en condition stérile (stérilisation des graines 15 min dans une solution de H₂O₂ 30 %), les plants (**A**) ont été transférés dans des pots contenant 25 g de perlite et 100 ml de solution nutritive carencée ou non en K et Mg (**D**). Après 10 jours de culture en phytotrons, 5 ml d'une suspension bactérienne de la souche PMB3(1) calibrée à DO = 1 ont été inoculés dans les pots contenant le pin en condition de carence. Après 2 mois d'incubation, les plants ont été mesurés (**B** et **C**) et pesés en masse sèche et humide.

Les conditions ont été testées en triplicats, les résultats obtenus ne sont pas significatifs et montrent seulement une tendance.

PMB3(1). Plusieurs contrôles seront réalisés correspondant à (i) un pot sans plante ni bactéries mais contenant le substrat de perlite, la biotite et le milieu carencé qui permettra d'évaluer la dissolution passive du minéral (ii) un plant en milieu carencé non-inoculé qui évaluera la croissance du pin en condition de carence (contrôle négatif), (iii) un plant non-inoculé en présence du milieu supplémenté en K et Mg qui évaluera la croissance du pin sans carence (contrôle positif) (Tableau 6.1).

Avant le début de l'expérience, il faudra mesurer le poids sec des graines au moment de l'incubation et leur minéralomasse. Après plusieurs mois d'incubation (2 à 3 mois), la minéralomasse des plantes sera mesurée ce qui permettra de déterminer un delta et donc la quantité réelle de nutriment assimilée lors de l'expérience. La taille des parties aériennes et souterraines sera également mesurée pour chaque condition. Enfin, la présence et la viabilité des bactéries après incubation devront être testées par dénombrement sur boîte et/ou par coloration live/dead au microscope.

Afin de mettre au point le protocole, des expériences préliminaires ont été réalisées (Figure 6.12) et ont démontré que la souche PMB3(1) se maintenait dans le système en pot fermé en présence de la plante pendant 2 mois. De plus, les plants avaient une tendance à croître de manière plus importante en présence de potassium et magnésium que les plants en condition de carence inoculé avec PMB3(1).

4.4. Perspectives plus larges

Mes travaux de thèse basés sur l'étude de la souche modèle *Collimonas pratensis* PMB3(1), ont permis de faire de nouvelles découvertes sur la fonction d'altération des minéraux. Néanmoins, il existe une grande variété de genres bactériens capables d'altérer les minéraux et les mécanismes de l'altération peuvent être différents (ex : GDH de type PQQ ou GMC, ou les deux). Ces variations montrent bien qu'il est nécessaire de continuer à étudier d'autres souches modèles pour élargir nos connaissances sur les mécanismes moléculaires de l'altération des minéraux et les gènes associés. Au-delà du modèle, les bactéries *in vivo* constituent le microbiote du sol, ainsi on peut considérer que les interactions physiques, les signaux chimiques et métaboliques ont probablement un rôle dans l'altération des minéraux.

Enfin, une meilleure connaissance des mécanismes développés par les bactéries pour altérer les minéraux dans les sols forestiers et de leur régulation pourront peut-être un jour permettre l'utilisation de bactéries en tant qu' (i) indicateur de fonction et (ii) agent promoteur de la

croissance des arbres dans les forêts. Cette application future doit d'abord passer par des études sur les bactéries altérantes et leur capacité promotrice de la croissance des plantes en conditions *in vitro* puis *in vivo*.

REFERENCES

- Abd-Alla, M.H. (1994) Solubilization of rock phosphates by *Rhizobium* and *Bradyrhizobium*. *Folia Microbiol (Praha)* **39**: 53–56.
- Abdulla, H. (2009) Bioweathering and biotransformation of granitic rock minerals by actinomycetes. *Microb Ecol* **58**: 753–761.
- Adamo, P. (2000) Weathering of rocks and neogenesis of minerals associated with lichen activity. *Appl Clay Sci* **16**: 229–256.
- Adesina, M.F., Lembke, A., Costa, R., Speksnijder, A., and Smalla, K. (2007) Screening of bacterial isolates from various European soils for *in vitro* antagonistic activity towards *Rhizoctonia solani* and *Fusarium oxysporum*: Site-dependent composition and diversity revealed. *Soil Biol Biochem* **39**: 2818–2828.
- Adhikary, H., Sanghavi, P.B., Macwan, S.R., Archana, G., and Naresh Kumar, G. (2014) Artificial citrate operon confers mineral phosphate solubilization ability to diverse fluorescent Pseudomonads. *PLoS ONE* **9**: e107554.
- Ahmed, E. and Holmström, S.J.M. (2015) Microbe–mineral interactions: The impact of surface attachment on mineral weathering and element selectivity by microorganisms. *Chem Geol* **403**: 13–23.
- Ahmed, E. and Holmström, S.J.M. (2014) Siderophores in environmental research: roles and applications: Siderophores in environmental research. *Microb Biotechnol* **7**: 196–208.
- Alder, N.N. and Theg, S.M. (2003) Energetics of protein transport across biological membranes: A study of the thylakoid delta pH-dependent/cpTat pathway. *Cell Press* **112**: 231–242.
- Alejandro, S., Höller, S., Meier, B., and Peiter, E. (2020) Manganese in plants: from acquisition to subcellular allocation. *Front Plant Sci* **11**: 300.
- An, R. and Moe, L.A. (2016) Regulation of pyrroloquinoline quinone-dependent glucose dehydrogenase activity in the model rhizosphere-dwelling bacterium *Pseudomonas putida* KT2440. *Appl Environ Microbiol* **82**: 4955–4964.
- Anders, S. and Huber, W. (2010) Differential expression analysis for sequence count data. *Nat Preced* 1–1.
- Andrews, S.C., Robinson, A.K., and Rodríguez-Quñones, F. (2003) Bacterial iron homeostasis. *FEMS Microbiol Rev* **27**: 215–237.
- Aslin, J., Mariani, E., Dawson, K., and Barsoum, M.W. (2019) Rippllocations provide a new mechanism for the deformation of phyllosilicates in the lithosphere. *Nat Commun* **10**: 1–9.
- Aspray, T.J., Hansen, S.K., and Burns, R.G. (2005) A soil-based microbial biofilm exposed to 2,4-D: bacterial community development and establishment of conjugative plasmid pJP4. *FEMS Microbiol Ecol* **54**: 317–327.
- Augusto, L., Ranger, J., and Bonneau, M. (2000b) Influence des essences sur la fertilité chimique des sols. Conséquences sur les choix sylvicoles. *Rev For Fr* 507.
- Augusto, L., Ranger, J., Ponette, Q., and Rapp, M. (2000a) Relationships between forest tree species, stand production and stand nutrient amount. *Ann For Sci* **57**: 313–324.
- Axelrod, P.E., Chow, M.L., Radomski, C.C., McDermott, J.M., and Davies, J. (2002) Molecular characterization of bacterial diversity from British Columbia forest soils subjected to disturbance. *Can J Microbiol* **48**: 655–674.
- Azaroual, S.E., Hazzoumi, Z., Mernissi, N.E., Aasfar, A., Meftah Kadmiri, I., and Bouizgarne, B. (2020) Role of inorganic phosphate solubilizing bacilli isolated from Moroccan phosphate rock mine and rhizosphere soils in wheat (*Triticum aestivum* L) phosphorus uptake. *Curr Microbiol* **77**: 2391–2404.
- Aziz, R.K., Bartels, D., Best, A.A., DeJongh, M., Disz, T., Edwards, R.A., et al. (2008) The RAST server: Rapid Annotations using Subsystems Technology. *BMC Genomics* **9**: 1–5.

- Babu-Khan, S., Yeo, T.C., Martin, W.L., Duron, M.R., Rogers, R.D., and Goldstein, A.H. (1995) Cloning of a mineral phosphate-solubilizing gene from *Pseudomonas cepacia*. *Appl Environ Microbiol* **61**: 972–978.
- Badeau, V. and Dambrine, E. (1999) Propriétés des sols forestiers français : Résultats du premier inventaire systématique. *Étude Gest Sols* **6**: 165–180.
- Bahr, H.-A., Fischer, G., and Weiss, H.-J. (1986) Thermal-shock crack patterns explained by single and multiple crack propagation. *J Mater Sci* **21**: 2716–2720.
- Balland, C., Poszwa, A., Leyval, C., and Mustin, C. (2010) Dissolution rates of phyllosilicates as a function of bacterial metabolic diversity. *Geochim Cosmochim Acta* **74**: 5478–5493.
- Balland-Bolou-Bi, C. and Poszwa, A. (2012) Effect of calco-magnesian amendment on the mineral weathering abilities of bacterial communities in acidic and silicate-rich soils. *Soil Biol Biochem* **50**: 108–117.
- Ballhausen, M.-B., Vandamme, P., and de Boer, W. (2016) Trait differentiation within the fungus-feeding (mycophagous) bacterial genus *Collimonas*. *PLOS ONE* **11**: e0157552.
- Ballhausen, M.-B., van Veen, J.A., Hundscheid, M.P.J., and de Boer, W. (2015) Methods for baiting and enriching fungus-feeding (mycophagous) rhizosphere bacteria. *Front Microbiol* **6**: 1416.
- Banfield, J.F., Barker, W.W., Welch, S.A., and Taunton, A. (1999) Biological impact on mineral dissolution: Application of the lichen model to understanding mineral weathering in the rhizosphere. *Proc Natl Acad Sci* **96**: 3404–3411.
- Bao, T., Zhang, X., Zhao, X., Rao, Z., Yang, T., and Yang, S. (2015) Regulation of the NADH pool and NADH/NADPH ratio redistributes acetoin and 2,3-butanediol proportion in *Bacillus subtilis*. *Biotechnol J* **10**: 1298–1306.
- Barker, W.W., Welch, S.A., and Banfield, J.F. (1997) Biogeochemical weathering of silicate minerals. In *Geomicrobiology*. Banfield, J.F. and Nealson, K.H. (eds). Berlin, Boston: De Gruyter, pp. 391–428.
- Barker, W.W., Welch, S.A., Chu, S., and Banfield, J.F. (1998) Experimental observations of the effects of bacteria on aluminosilicate weathering. *Am Mineral* **83**: 1551–1563.
- Barman, J., Samanta, A., Saha, B., and Datta, S. (2016) Mycorrhiza: The oldest association between plant and fungi. *Resonance* **21**: 1093–1104.
- Barthod, Ch. and Touzet, G. (1994) De Strasbourg à Helsinki les deux premières conférences ministérielles pour la protection des forêts en europe. *Rev For Fr* **4**: 319–333.
- Bateman, R.M. and Catt, J.A. (1985) Modification of heavy mineral assemblages in English coversands by acid pedochemical weathering. *CATENA* **12**: 1–21.
- Bellenberg, S., Buetti-Dinh, A., Galli, V., Ilie, O., Herold, M., Christel, S., et al. (2018) Automated microscopic analysis of metal sulfide colonization by acidophilic microorganisms. *Appl Environ Microbiol* **84**: e01835-18.
- Berg, G. (2009) Plant–microbe interactions promoting plant growth and health: perspectives for controlled use of microorganisms in agriculture. *Appl Microbiol Biotechnol* **84**: 11–18.
- Berks, B.C., Sargent, F., and Palmer, T. (2000) The Tat protein export pathway. *Mol Microbiol* **35**: 260–274.
- Bernabeu, P., García, S., Ferreyra, G., Guidi, V., Galar, M., Boiardi, J., and Luna, M. (2016) Mineral phosphate solubilization in *Burkholderia tropica* involves an inducible PQQ-glucose dehydrogenase. *Br Microbiol Res J* **13**: 1–8.
- Berner, R.A. (2003) The long-term carbon cycle, fossil fuels and atmospheric composition. *Nature* **426**: 323–326.
- Besson, H., Caillère, S., and Hénin, S. (1966) Observation sur la transformation mica-vermiculite. *Bull Groupe Fr Argiles* **18**: 101–105.

- Bhattacharya, A. (2011) Siderophore mediated metal uptake by *Pseudomonas fluorescens* and its comparison to Iron (III) chelation. *Ceylon J Sci Biol Sci* **39**: 147–155.
- Blanco, J.A., Zavala, M.A., Imbert, J.B., and Castillo, F.J. (2005) Sustainability of forest management practices: Evaluation through a simulation model of nutrient cycling. *For Ecol Manag* **213**: 209–228.
- Blume, E., Bischoff, M., Reichert, J.M., Moorman, T., Konopka, A., and Turco, R.F. (2002) Surface and subsurface microbial biomass, community structure and metabolic activity as a function of soil depth and season. *Appl Soil Ecol* **20**: 171–181.
- Bonneau, M. (1985) Le dépérissement des forêts. *Aménage Nat* **80**: 18–21.
- Bonneau, M. (1989) Que sait-on maintenant des causes du « dépérissement » des forêts ? *Rev For Fr* **5**: 367–386.
- Bonneville, S., Smits, M.M., Brown, A., Harrington, J., Leake, J.R., Brydson, R., and Benning, L.G. (2009) Plant-driven fungal weathering: Early stages of mineral alteration at the nanometer scale. *Geology* **37**: 615–618.
- Borgi, M.A., Saidi, I., Moula, A., Rhimi, S., and Rhimi, M. (2020) The attractive *Serratia plymuthica* BMA1 strain with high rock phosphate-solubilizing activity and its effect on the growth and phosphorus uptake by *Vicia faba* L. plants. *Geomicrobiol J* **37**: 437–445.
- Boukhalfa, H., Reilly, S.D., Michalczyk, R., Iyer, S., and Neu, M.P. (2006) Iron(III) coordination properties of a pyoverdine siderophore produced by *Pseudomonas putida* ATCC 33015. *Inorg Chem* **45**: 5607–5616.
- Brammell, A. and Leech, J.G.C. (1937) Hydrolysis of rock-forming minerals. *Nature* **139**: 754–755.
- Brantley, S.L. (2008) Kinetics of mineral dissolution. In *Kinetics of water-rock interaction*. Brantley, S.L., Kubicki, J.D., and White, A.F. (eds). New York, NY: Springer, pp. 151–210.
- Braun, V., Mahren, S., and Ogierman, M. (2003) Regulation of the FecI-type ECF sigma factor by transmembrane signalling. *Curr Opin Microbiol* **6**: 173–180.
- Brêthes, A. (2012) Les amendements calco-magnésiens en forêt - Impact sur le fonctionnement de l'écosystème - Analyse bibliographique, Office National des Forêts.
- Brickman, T.J. and Armstrong, S.K. (2012) Iron and pH-responsive FtrABCD ferrous iron utilization system of *Bordetella* species. *Mol Microbiol* **86**: 580–593.
- Brito, L.F., López, M.G., Straube, L., Passaglia, L.M.P., and Wendisch, V.F. (2020) Inorganic phosphate solubilization by rhizosphere bacterium *Paenibacillus sonchi*: gene expression and physiological functions. *Front Microbiol* **11**: 1–21.
- Brokx, S.J., Rothery, R.A., Zhang, G., Ng, D.P., and Weiner, J.H. (2005) Characterization of an *Escherichia coli* sulfite oxidase homologue reveals the role of a conserved active site cysteine in assembly and function. *Biochemistry* **44**: 10339–10348.
- Bruand, A. (2009) Qu'est ce que le Sol ? In *Le Sol*. pp. 12–17.
- Brucker, E., Kernchen, S., and Spohn, M. (2020) Release of phosphorus and silicon from minerals by soil microorganisms depends on the availability of organic carbon. *Soil Biol Biochem* **143**: 107737.
- Brünker, P., Altenbuchner, J., Kulbe, K.D., and Mattes, R. (1997) Cloning, nucleotide sequence and expression of a mannitol dehydrogenase gene from *Pseudomonas fluorescens* DSM 50106 in *Escherichia coli*. *Biochim Biophys Acta BBA - Gene Struct Expr* **1351**: 157–167.
- Brunner, I., Plötze, M., Rieder, S., Zumsteg, A., Furrer, G., and Frey, B. (2011) Pioneering fungi from the Damma glacier forefield in the Swiss Alps can promote granite weathering. *Geobiology* **9**: 266–279.

- Bryce, C.C., Le Bihan, T., Martin, S.F., Harrison, J.P., Bush, T., Spears, B., et al. (2016) Rock geochemistry induces stress and starvation responses in the bacterial proteome: Rock-driven changes in the bacterial proteome. *Environ Microbiol* **18**: 1110–1121.
- Buch, A.D., Archana, G., and Kumar, G.N. (2009) Enhanced citric acid biosynthesis in *Pseudomonas fluorescens* ATCC 13525 by overexpression of the *Escherichia coli* citrate synthase gene. *Microbiology* **155**: 2620–2629.
- Butt, A.T. and Thomas, M.S. (2017) Iron acquisition mechanisms and their role in the virulence of *Burkholderia* species. *Front Cell Infect Microbiol* **7**:
- Callahan, J.H. and Cook, K.D. (1984) Mechanism of surfactant-induced changes in the visible spectrometry of metal-Chrome Azurol S complexes. *Anal Chem* **56**: 1632–1640.
- Calvaruso, C., Mareschal, L., Turpault, M.-P., and Leclerc, E. (2009) Rapid clay weathering in the rhizosphere of norway spruce and oak in an acid forest ecosystem. *Soil Sci Soc Am J* **73**: 331–338.
- Calvaruso, C., Turpault, M.-P., and Frey-Klett, P. (2006) Root-associated bacteria contribute to mineral weathering and to mineral nutrition in trees: a budgeting analysis. *Appl Environ Microbiol* **72**: 1258–1266.
- Calvaruso, C., Turpault, M.-P., Leclerc, E., and Frey-Klett, P. (2007) Impact of ectomycorrhizosphere on the functional diversity of soil bacterial and fungal communities from a forest stand in relation to nutrient mobilization processes. *Microb Ecol* **54**: 567–577.
- Calvaruso, C., Turpault, M.-P., Leclerc, E., Ranger, J., Garbaye, J., Uroz, S., and Frey-Klett, P. (2010) Influence of forest trees on the distribution of mineral weathering-associated bacterial communities of the *Scleroderma citrinum* mycorrhizosphere. *Appl Environ Microbiol* **76**: 4780–4787.
- Cao, Y., Wei, X., Cai, P., Huang, Q., Rong, X., and Liang, W. (2011) Preferential adsorption of extracellular polymeric substances from bacteria on clay minerals and iron oxide. *Colloids Surf B Biointerfaces* **83**: 122–127.
- Carpenter, D., Hodson, M.E., Eggleton, P., and Kirk, C. (2007) Earthworm induced mineral weathering: Preliminary results. *Eur J Soil Biol* **43**: S176–S183.
- Carroll, C.S. and Moore, M.M. (2018) Ironing out siderophore biosynthesis: a review of non-ribosomal peptide synthetase (NRPS)-independent siderophore synthetases. *Crit Rev Biochem Mol Biol* **53**: 356–381.
- Carvalho, L.C., Dennis, P.G., Fedoseyenko, D., Hajirezaei, M.-R., Borriss, R., and von Wirén, N. (2011) Root exudation of sugars, amino acids, and organic acids by maize as affected by nitrogen, phosphorus, potassium, and iron deficiency. *J Plant Nutr Soil Sci* **174**: 3–11.
- Cavener, D.R. (1992) GMC oxidoreductases: A newly defined family of homologous proteins with diverse catalytic activities. *J Mol Biol* **223**: 811–814.
- Certini, G., Campbell, C.D., and Edwards, A.C. (2004) Rock fragments in soil support a different microbial community from the fine earth. *Soil Biol Biochem* **36**: 1119–1128.
- Challis, G.L. (2005) A widely distributed bacterial pathway for siderophore biosynthesis independent of NonRibosomal Peptide Synthetases. *ChemBioChem* **6**: 601–611.
- Chapman, H.D. (1965) Cation-Exchange Capacity. In *Methods of Soil Analysis: Part 2 Chemical and Microbiological Properties*. Madison, USA: Soil Science Society of America, pp. 891–901.
- Charre, J.-P. and Lautridou, J.-P. (1975) Expériences de cryoclastie sur des grès et roches vertes. *Rev Géographie Alp* **63**: 253–261.
- Chen, J., Blume, H.-P., and Beyer, L. (2000) Weathering of rocks induced by lichen colonization — a review. *CATENA* **39**: 121–146.

- Chhabra, S., Brazil, D., Morrissey, J., Burke, J.I., O’Gara, F., and N. Dowling, D. (2013) Characterization of mineral phosphate solubilization traits from a barley rhizosphere soil functional metagenome. *MicrobiologyOpen* **2**: 717–724.
- Chilton, M.-D., Currier, T.C., Farrand, S.K., Bendich, A.J., Gordon, M.P., and Nester, E.W. (1974) *Agrobacterium tumefaciens* DNA and PS8 bacteriophage DNA not detected in crown gall tumors. *Proc Natl Acad Sci* **71**: 3672–3676.
- Chow, M.L., Radomski, C.C., McDermott, J.M., Davies, J., and Axelrod, P.E. (2002) Molecular characterization of bacterial diversity in Lodgepole pine (*Pinus contorta*) rhizosphere soils from British Columbia forest soils differing in disturbance and geographic source. *FEMS Microbiol Ecol* **42**: 347–357.
- Clarkson, D.T. and Hanson, J.B. (1980) The mineral nutrition of higher plants. *Annu Rev Plant Physiol* **31**: 239–298.
- Cole, D.W. and Gessel, S.P. (1992) Fundamentals of tree nutrition. In *Forest fertilization: sustaining and improving nutrition and growth of western forests*. Seattle: Institute of Forest Resources Contribution. pp. 7–16.
- Colin, Y., Nicolitch, O., Turpault, M.-P., and Uroz, S. (2017a) Mineral types and tree species determine the functional and taxonomic structures of forest soil bacterial communities. *Appl Environ Microbiol* **83**: e02684-16.
- Collier, G.F. and Greenwood, D.J. (1977) The influence of solution concentration of aluminium, arsenic, boron and copper on root growth in relation to the phytotoxicity of pulverised fuel ash. *J Sci Food Agric* **28**: 145–151.
- Collignon, C., Uroz, S., Turpault, M.-P., and Frey-Klett, P. (2011) Seasons differently impact the structure of mineral weathering bacterial communities in beech and spruce stands. *Soil Biol Biochem* **43**: 2012–2022.
- Cornejo, J. and Hermosín, M.C. (1996) Interaction of humic substances and soil clays. In *Humic substances in terrestrial ecosystems*. Elsevier Sciences BV, pp. 595–624.
- Courty, P.-E., Buée, M., Diedhiou, A.G., Frey-Klett, P., Le Tacon, F., Rineau, F., et al. (2010) The role of ectomycorrhizal communities in forest ecosystem processes: New perspectives and emerging concepts. *Soil Biol Biochem* **42**: 679–698.
- Crawford, R.H., Floyd, M., and Li, C.Y. (2000) Degradation of serpentine and muscovite rock minerals and immobilization of cations by soil *Penicillium* spp. **40**: 315–322.
- Crespo, J. (2011) Mineral phosphate solubilization activity of *Gluconacetobacter diazotrophicus* under P-limitation and plant root environment. *Agric Sci* **2**: 16–22.
- Curl, E.A. and Truelove, B. (1986) Root Exudates. In *The Rhizosphere*. Advanced Series in Agricultural Sciences. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, pp. 55–92.
- Currie, H.A. and Perry, C.C. (2007) Silica in plants: biological, biochemical and chemical studies. *Ann Bot* **100**: 1383–1389.
- Daddaoua, A., Corral-Lugo, A., Ramos, J.-L., and Krell, T. (2017) Identification of GntR as regulator of the glucose metabolism in *Pseudomonas aeruginosa*: GntR mediated regulation of glucose metabolism. *Environ Microbiol* **19**: 3721–3733.
- Daddaoua, A., Krell, T., Alfonso, C., Morel, B., and Ramos, J.-L. (2010) Compartmentalized glucose metabolism in *Pseudomonas putida* is controlled by the PtxS repressor. *J Bacteriol* **192**: 4357–4366.
- Dana, J.D. (1855) *Manual of Mineralogy*, Durrie & Peck.
- Datta, M., Banik, S., and Gupta, R.K. (1982) Studies on the efficacy of a phytohormone producing phosphate solubilizing *Bacillus firmus* in augmenting paddy yield in acid soils of Nagaland. *Plant Soil* **69**: 365–373.
- David, S.R. and Geoffroy, V.A. (2020) A review of asbestos bioweathering by siderophore-producing *Pseudomonas*: a potential strategy of bioremediation. *Microorganisms* **8**: 1870.

- David, S.R., Ihiawakrim, D., Regis, R., and Geoffroy, V.A. (2020) Iron removal from raw asbestos by siderophores-producing *Pseudomonas*. *J Hazard Mater* **385**: 121563.
- De Boer, W., Klein Gunnewiek, P.J.A., Kowalchuk, G.A., and Van Ven, J.A. (2001) Growth of chitinolytic dune soil β -subclass proteobacteria in response to invading fungal hyphae. *Appl Environ Microbiol* **67**: 3358–3362.
- De Boer, W., Klein Gunnewiek, P.J.A., Lafeber, P., Janse, J.D., Spit, B.E., and Woldendorp, J.W. (1998b) Anti-fungal properties of chitinolytic dune soil bacteria. *Soil Biol Biochem* **30**: 193–203.
- De Boer, W., Klein Gunnewiek, P.J.A., and Woldendorp, J.W. (1998a) Suppression of hyphal growth of soil-borne fungi by dune soils from vigorous and declining stands of *Ammophila arenaria*. *New Phytol* **138**: 107–116.
- De Boer, W., Leveau, J.H.J., Kowalchuk, G.A., Gunnewiek, P.J., Abeln, E.C., Figge, F.J., et al. (2004) *Collimonas fungivorans* gen. nov., sp. nov., a chitinolytic soil bacterium with the ability to grow on living fungal hyphae. *Int J Syst Evol Microbiol* **54**: 857–864.
- De Mey, M., De Maeseneire, S., Soetaert, W., and Vandamme, E. (2007) Minimizing acetate formation in *E. coli* fermentations. *J Ind Microbiol Biotechnol* **34**: 689–700.
- Dehner, C.A., Awaya, J.D., Maurice, P.A., and DuBois, J.L. (2010) Roles of siderophores, oxalate, and ascorbate in mobilization of iron from hematite by the aerobic bacterium *Pseudomonas mendocina*. *Appl Environ Microbiol* **76**: 2041–2048.
- Delpoux, M. (1972) Écosystème et paysage. *Rev Géographique Pyrén Sud-Ouest* **43**: 157–174.
- Derrien, D., Marol, C., and Balesdent, J. (2004) The dynamics of neutral sugars in the rhizosphere of wheat. An approach by ^{13}C pulse-labelling and GC/C/IRMS. *Plant Soil* **267**: 243–253.
- Ditta, A., Imtiaz, M., Mehmood, S., Rizwan, M.S., Mubeen, F., Aziz, O., et al. (2018) Rock phosphate-enriched organic fertilizer with phosphate-solubilizing microorganisms improves nodulation, growth, and yield of legumes. *Commun Soil Sci Plant Anal* **49**: 2715–2725.
- Dixon, J.B., Weed, S.B., and Dinauer, R.C. eds. (1989) Minerals in soil environments, 2nd ed. Madison, Wis., USA: Soil Science Society of America.
- Doan, H.K., Maharaj, N.N., Kelly, K.N., Miyao, E.M., Davis, R.M., and Leveau, J.H.J. (2020) Antimycotal activity of *Collimonas* isolates and synergy-based biological control of Fusarium wilt of tomato. *Phytobiomes J* **4**: 64–74.
- Dominguez, D.C. (2004) Calcium signalling in bacteria: Calcium in bacteria. *Mol Microbiol* **54**: 291–297.
- Dransart, V.V.- (1995) Novel Ti plasmids in *Agrobacterium* strains isolated from fig tree and *Chrysanthemum* tumors and their opinelike molecules. *Mol Plant Microbe Interact* **8**: 311–321.
- Drever, J.I. (1994) The effect of land plants on weathering rates of silicate minerals. *Geochim Cosmochim Acta* **58**: 2325–2332.
- Driessen, A.J. and Wickner, W. (1991) Proton transfer is rate-limiting for translocation of precursor proteins by the *Escherichia coli* translocase. *Proc Natl Acad Sci* **88**: 2471–2475.
- Drummelsmith, J., Amor, P.A., and Whitfield, C. (1997) Polymorphism, duplication, and IS1-mediated rearrangement in the chromosomal his-rfb-gnd region of *Escherichia coli* strains with group IA and capsular K antigens. *J Bacteriol* **179**: 3232–3238.
- Duan, Y.X., Chen, T., Chen, X., and Zhao, X.M. (2010) Overexpression of glucose-6-phosphate dehydrogenase enhances riboflavin production in *Bacillus subtilis*. *Appl Microbiol Biotechnol* **85**: 1907–1914.
- Duine, J.A. (1991) Quinoproteins: enzymes containing the quinonoid cofactor pyrroloquinoline quinone, topaquinone or tryptophan-tryptophan quinone. *Eur J Biochem* **200**: 271–284.

- Edwards, C.A. and Bohlen, P.J. (1996) *Biology and Ecology of Earthworms*, Springer Science & Business Media.
- Elhassanny, A.E.M., Anderson, E.S., Menscher, E.A., and Roop, R.M. (2013) The ferrous iron transporter FtrABCD is required for the virulence of *Brucella abortus* 2308 in mice: Ferrous iron transport and virulence in *Brucella*. *Mol Microbiol* **88**: 1070–1082.
- Esperschütz, J., Buegger, F., Winkler, J.B., Munch, J.C., Schloter, M., and Gattinger, A. (2009) Microbial response to exudates in the rhizosphere of young beech trees (*Fagus sylvatica* L.) after dormancy. *Soil Biol Biochem* **41**: 1976–1985.
- Esperschütz, J., Gattinger, A., Buegger, F., Lang, H., Munch, J.C., Schloter, M., and Winkler, J.B. (2009) A continuous labelling approach to recover photosynthetically fixed carbon in plant tissue and rhizosphere organisms of young beech trees (*Fagus sylvatica* L.) using ¹³C depleted CO₂. *Plant Soil* **323**: 21–29.
- Fankem, H., Nwaga, D., Deubel, A., Dieng, L., Merbach, W., and Etoa, F.X. (2006) Occurrence and functioning of phosphate solubilizing microorganisms from oil palm tree (*Elaeis guineensis*) rhizosphere in Cameroon. *Afr J Biotechnol* **5**: 2450–2460.
- FAO (2015) Termes et Définitions. *Doc Trav L'évaluation Ressour For* 37.
- Farrell, E.P., Führer, E., Ryan, D., Andersson, F., Hüttl, R., and Piussi, P. (2000) European forest ecosystems: building the future on the legacy of the past. *For Ecol Manag* **132**: 5–20.
- Favre, N., Christ, M.L., and Pierre, A.C. (2009) Biocatalytic capture of CO₂ with carbonic anhydrase and its transformation to solid carbonate. *J Mol Catal B Enzym* **60**: 163–170.
- Fayiga, A.O. and Nwoke, O.C. (2016) Phosphate rock: origin, importance, environmental impacts, and future roles. *Environ Rev* **24**: 403–415.
- Ferrand, J., Rossano, S., Loisel, C., Trcera, N., van Hullebusch, E.D., Bousta, F., and Pallot-Frossard, I. (2015) Browning phenomenon of medieval stained glass windows. *Anal Chem* **87**: 3662–3669.
- Ferret, C., Sterckeman, T., Cornu, J.-Y., Gangloff, S., Schalk, I.J., and Geoffroy, V.A. (2014) Siderophore-promoted dissolution of smectite by fluorescent *Pseudomonas*: Smectite alteration by bacteria. *Environ Microbiol Rep* **6**: 459–467.
- Ferri, S., Kojima, K., and Sode, K. (2011) Review of glucose oxidases and glucose dehydrogenases: A bird's eye view of glucose sensing enzymes. *J Diabetes Sci Technol* **5**: 1068–1076.
- Fichter, J., Turpault, M.-P., Dambrine, E., and Ranger, J. (1998) Localization of base cations in particle size fractions of acid forest soils (Vosges Mountains, N-E France). *Geoderma* **82**: 295–314.
- Flamholz, A., Noor, E., Bar-Even, A., Liebermeister, W., and Milo, R. (2013) Glycolytic strategy as a tradeoff between energy yield and protein cost. *Proc Natl Acad Sci* **110**: 10039–10044.
- Folman, L.B., Klein Gunnewiek, P.J.A., Boddy, L., and De Boer, W. (2008) Impact of white-rot fungi on numbers and community composition of bacteria colonizing beech wood from forest soil: Impact of white-rot fungi on bacteria colonizing wood. *FEMS Microbiol Ecol* **63**: 181–191.
- Frey, B., Rieder, S.R., Brunner, I., Plotze, M., Koetzsch, S., Lapanje, A., et al. (2010) Weathering-associated bacteria from the Damma glacier forefield: physiological capabilities and impact on granite dissolution. *Appl Environ Microbiol* **76**: 4788–4796.
- Frey, P., Frey-Klett, P., Garbaye, J., Berge, O., and Heulin, T. (1997) Metabolic and genotypic fingerprinting of fluorescent pseudomonads associated with the Douglas Fir-*Laccaria bicolor* mycorrhizosphere. *Appl Environ Microbiol* **63**: 1852–1860.

- Frey-Klett, P., Chavatte, M., Clause, M.-L., Courrier, S., Roux, C.L., Raaijmakers, J., et al. (2005) Ectomycorrhizal symbiosis affects functional diversity of rhizosphere fluorescent pseudomonads. *New Phytol* **165**: 317–328.
- Fuhrer, T., Fischer, E., and Sauer, U. (2005) Experimental identification and quantification of glucose metabolism in seven bacterial species. *J Bacteriol* **187**: 1581–1590.
- Garrels, R.M. and Mackenzie, F.T. (1971) Evolution of sedimentary rocks, New York: WW Norton & Co.
- Gehrke, T., Telegdi, J., Thierry, D., and Sand, W. (1998) Importance of extracellular polymeric substances from *Thiobacillus ferrooxidans* for bioleaching. *Appl Environ Microbiol* **64**: 2743–2747.
- Girardclos, O. and Petit, C. (2011) Dendroarchaeological contributions to the history of forest exploitation: the case of the Gallo-roman settlement of Oedenburg (Alsace, France) between 10 AD and 180 AD. In *Tree Rings, Art, Archaeology: Proceedings of a conference*. Fraiture, P. (ed). Scientia Artis 7, pp. 77–96.
- GIS Sol (2011) L'état des sols de France: les services rendus par les sols, la diversité des sols de France, l'état des sols de France et son évolution, S.I.: Groupement d'intérêt scientifique sur les sols (France).
- Gobat, J.-M., Aragno, M., and Matthey, W. (1998) Le Sol vivant. Bases de pédologie, biologie des sols, Lausanne: Presses Polytechniques et Universitaires Romandes.
- Goldstein, A., Lester, T., and Brown, J. (2003) Research on the metabolic engineering of the direct oxidation pathway for extraction of phosphate from ore has generated preliminary evidence for PQQ biosynthesis in *Escherichia coli* as well as a possible role for the highly conserved region of quinoprotein dehydrogenases. *Biochim Biophys Acta BBA - Proteins Proteomics* **1647**: 266–271.
- Goldstein, A.H. (1995) Recent progress in understanding the molecular genetics and biochemistry of calcium phosphate solubilization by Gram negative bacteria. *Biol Agric Hortic* **12**: 185–193.
- Goldstein, A.H., Braverman, K., and Osorio, N. (1999) Evidence for mutualism between a plant growing in a phosphate-limited desert environment and a mineral phosphate solubilizing (MPS) rhizobacterium. *FEMS Microbiol Ecol* **30**: 295–300.
- González, I., Cao, K.-A.L., Davis, M.J., and Déjean, S. (2012) Visualising associations between paired 'omics' data sets. *BioData Min* **5**: 1–23.
- Gorbushina, A.A. and Broughton, W.J. (2009) Microbiology of the atmosphere-rock interface: how biological interactions and physical stresses modulate a sophisticated microbial ecosystem. *Annu Rev Microbiol* **63**: 431–450.
- Grayston, S.J., Vaughan, D., and Jones, D. (1997) Rhizosphere carbon flow in trees, in comparison with annual plants: the importance of root exudation and its impact on microbial activity and nutrient availability. *Appl Soil Ecol* **5**: 29–56.
- Gupta, G., Parihar, S.S., Ahirwar, N.K., Snehi, S.K., and Singh, V. (2015) Plant growth promoting rhizobacteria (PGPR): current and future prospects for development of sustainable agriculture. *J Microb Biochem Technol* **7**: 96–102.
- Gupta, M., Bisht, S., Singh, B., Gulati, A., and Tewari, R. (2011) Enhanced biomass and steviol glycosides in *Stevia rebaudiana* treated with phosphate-solubilizing bacteria and rock phosphate. *Plant Growth Regul* **65**: 449–457.
- Gyaneshwar, P., Kumar, G.N., and Parekh, L.J. (1998) Effect of buffering on the phosphate-solubilizing ability of microorganisms. **14**: 669–673.
- Gyaneshwar, P., Kumar, G.N., Parekh, L.J., and Poole, P.S. (2002) Role of soil microorganisms in improving P nutrition of plants. *Plant Soil* **245**: 83–93.
- Gyaneshwar, P., Parekh, L.J., Archana, G., Poole, P.S., Collins, M.D., Hutson, R.A., and Kumar, G.N. (1999) Involvement of a phosphate starvation inducible glucose

- dehydrogenase in soil phosphate solubilization by *Enterobacter asburiae*. *FEMS Microbiol Lett* **171**: 223–229.
- Haas, J.R. and Purvis, A.W. (2006) Lichen biogeochemistry. In *Fungi in Biochemical cycles*. pp. 344–376.
- Hall, K., Guglielmin, M., and Strini, A. (2008) Weathering of granite in Antarctica: II. Thermal stress at the grain scale. *Earth Surf Process Landf* **33**: 475–493.
- Hameeda, B., Reddy, Y.H.K., Rupela, O.P., Kumar, G.N., and Reddy, G. (2006) Effect of carbon substrates on rock phosphate solubilization by bacteria from composts and macrofauna. *Curr Microbiol* **53**: 298–302.
- Han, S.H., Kim, C.H., Lee, J.H., Park, J.Y., Cho, S.M., Park, S.K., et al. (2008) Inactivation of *pqq* genes of *Enterobacter intermedium* 60-2G reduces antifungal activity and induction of systemic resistance. *FEMS Microbiol Lett* **282**: 140–146.
- Harrington, J.M., Parker, D.L., Bargar, J.R., Jarzecki, A.A., Tebo, B.M., Sposito, G., and Duckworth, O.W. (2012) Structural dependence of Mn complexation by siderophores: Donor group dependence on complex stability and reactivity. *Geochim Cosmochim Acta* **88**: 106–119.
- Hartmann, E.M., Allain, F., Gaillard, J.-C., Pible, O., and Armengaud, J. (2014) Taking the shortcut for high-throughput shotgun proteomic analysis of bacteria. In *Host-Bacteria Interactions*. Methods in Molecular Biology. Vergunst, A.C. and O’Callaghan, D. (eds). New York, NY: Springer New York, pp. 275–285.
- Hartmann, M., Niklaus, P.A., Zimmermann, S., Schmutz, S., Kremer, J., Abarenkov, K., et al. (2014) Resistance and resilience of the forest soil microbiome to logging-associated compaction. *ISME J* **8**: 226–244.
- Harvey, P.R., Warren, R.A., and Wakelin, S. (2009) Potential to improve root access to phosphorus: the role of non-symbiotic microbial inoculants in the rhizosphere. *Crop Pasture Sci* **60**: 144–151.
- Hassan, M.-T., van der Lelie, D., Springael, D., Römling, U., Ahmed, N., and Mergeay, M. (1999) Identification of a gene cluster, *czr*, involved in cadmium and zinc resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. *Gene* **238**: 417–425.
- Hayoun, K., Gouveia, D., Grenga, L., Pible, O., Armengaud, J., and Alpha-Bazin, B. (2019) Evaluation of sample preparation methods for fast proteotyping of microorganisms by tandem mass spectrometry. *Front Microbiol* **10**: 1985.
- Hepler, P.K. and Wayne, R.O. (1985) Calcium and plant development. *Annu Rev Plant Physiol* **36**: 397–439.
- Hernandez, M.E., Kappler, A., and Newman, D.K. (2004) Phenazines and other redox-active antibiotics promote microbial mineral reduction. *Appl Environ Microbiol* **70**: 921–928.
- Hersman, L., Lloyd, T., and Sposito, G. (1995) Siderophore-promoted dissolution of hematite. *Geochim Cosmochim Acta* **59**: 3327–3330.
- Hilley, G.E., Chamberlain, C.P., Moon, S., Porder, S., and Willett, S.D. (2010) Competition between erosion and reaction kinetics in controlling silicate-weathering rates. *Earth Planet Sci Lett* **293**: 191–199.
- Hinsinger, P., Plassard, C., Tang, C., and Jaillard, B. (2003) Origins of root-mediated pH changes in the rhizosphere and their responses to environmental constraints: A review. *Plant Soil* **248**: 43–59.
- Hirsch, P., Eckhardt, F.E.W., and Palmer Jr., R.J. (1995) Fungi active in weathering of rock and stone monuments. *Can J Bot* **73**: 1384–1390.
- Hoffland, E., Kuyper, T.W., Wallander, H., Plassard, C., Gorbushina, A.A., Haselwandter, K., et al. (2004) The role of fungi in weathering. *Front Ecol Environ* **2**: 258–264.

- Holmén, B.A. and Casey, W.H. (1996) Hydroxamate ligands, surface chemistry, and the mechanism of ligand-promoted dissolution of goethite [α -FeOOH(s)]. *Geochim Cosmochim Acta* **60**: 4403–4416.
- Höppener-Ogawa, S., de Boer, W., Leveau, J.H.J., van Veen, J.A., de Brandt, E., Vanlaere, E., et al. (2008) *Collimonas arenae* sp. nov. and *Collimonas pratensis* sp. nov., isolated from (semi-)natural grassland soils. *Int J Syst Evol Microbiol* **58**: 414–419.
- Höppener-Ogawa, S., Leveau, J.H.J., Smant, W., van Veen, J.A., and de Boer, W. (2007) Specific detection and real-time PCR quantification of potentially mycophagous bacteria belonging to the genus *Collimonas* in different Soil ecosystems. *Appl Environ Microbiol* **73**: 4191–4197.
- Hu, X., Chen, J., and Guo, J. (2006) Two phosphate- and potassium-solubilizing bacteria isolated from Tianmu mountain, Zhejiang, China. *World J Microbiol Biotechnol* **22**: 983–990.
- Huang, J., Sheng, X.-F., Xi, J., He, L.-Y., Huang, Z., Wang, Q., and Zhang, Z.-D. (2014) Depth-related changes in community structure of culturable mineral weathering bacteria and in weathering patterns caused by them along two contrasting soil profiles. *Appl Environ Microbiol* **80**: 29–42.
- Huang, Y., Zhou, E., Jiang, C., Jia, R., Liu, S., Xu, D., et al. (2018) Endogenous phenazine-1-carboxamide encoding gene PhzH regulated the extracellular electron transfer in biocorrosion of stainless steel by marine *Pseudomonas aeruginosa*. *Electrochem Commun* **94**: 9–13.
- IGN (2020) Le mémento inventaire forestier. *Inst Natl Inf Géographique For.*
- Illmer, P. and Schinner, F. (1995) Solubilization of inorganic calcium phosphates—Solubilization mechanisms. *Soil Biol Biochem* **27**: 257–263.
- Intorne, A.C., de Oliveira, M.V.V., Lima, M.L., da Silva, J.F., Olivares, F.L., and de Souza Filho, G.A. (2009) Identification and characterization of *Gluconacetobacter diazotrophicus* mutants defective in the solubilization of phosphorus and zinc. *Arch Microbiol* **191**: 477–483.
- Iskandar, I.K. and Syers, J.K. (1972) Metal-complex formation by lichen compounds. *J Soil Sci* **23**: 255–265.
- Jha, A., Saxena, J., and Sharma, V. (2013) Investigation on phosphate solubilization potential of agricultural soil bacteria as affected by different phosphorus sources, temperature, salt, and pH. *Commun Soil Sci Plant Anal* **44**: 2443–2458.
- Johnstone, T.C. and Nolan, E.M. (2015) Beyond iron: non-classical biological functions of bacterial siderophores. *Dalton Trans* **44**: 6320–6339.
- Jolivet, C., Angers, D.A., Chantigny, M.H., Andreux, F., and Arrouays, D. (2006) Carbohydrate dynamics in particle-size fractions of sandy spodosols following forest conversion to maize cropping. *Soil Biol Biochem* **38**: 2834–2842.
- Jonard, M., Fürst, A., Verstraeten, A., Thimonier, A., Timmermann, V., Potočić, N., et al. (2015) Tree mineral nutrition is deteriorating in Europe. *Glob Change Biol* **21**: 418–430.
- Jones, A.A. and Bennett, P.C. (2017) Mineral ecology: surface specific colonization and geochemical drivers of biofilm accumulation, composition, and phylogeny. *Front Microbiol* **8**: 491.
- Jones, C. and Jacobsen, J. (2005) Plant nutrition and soil fertility. *Nutr Manag Module* **2**: 1–11.
- Jongmans, A.G., van Breemen, N., Lundström, U., van Hees, P.A.W., Finlay, R.D., Srinivasan, M., et al. (1997) Rock-eating fungi. *Nature* **389**: 682–683.
- Jouquet, P., Mamou, L., Lepage, M., and Velde, B. (2002) Effect of termites on clay minerals in tropical soils: fungus-growing termites as weathering agents. *Eur J Soil Sci* **53**: 521–528.

- Jurtshuk, P. (1996) Bacterial metabolism. In *Medical microbiology*.
- Kadi, N. and Challis, G.L. (2009) Siderophore biosynthesis: a substrate specificity assay for nonribosomal peptide synthetase-independent siderophore synthetases involving trapping of acyl-adenylate intermediates with hydroxylamine. In *Methods in Enzymology*. Elsevier, pp. 431–457.
- Kalač, P. (2013) A review of chemical composition and nutritional value of wild-growing and cultivated mushrooms. *J Sci Food Agric* **93**: 209–218.
- Kalinowski, B.E., Liermann, L.J., Givens, S., and Brantley, S.L. (2000) Rates of bacteria-promoted solubilization of Fe from minerals: a review of problems and approaches. *Chem Geol* **169**: 357–370.
- Kamilova, F., Leveau, J.H.J., and Lugtenberg, B. (2007) *Collimonas fungivorans*, an unpredicted in vitro but efficient in vivo biocontrol agent for the suppression of tomato foot and root rot. *Environ Microbiol* **9**: 1597–1603.
- Kaur, G. and Reddy, M.S. (2015) Effects of phosphate-solubilizing bacteria, rock phosphate and chemical fertilizers on maize-wheat cropping cycle and economics. *Pedosphere* **25**: 428–437.
- Kelly, E.F., Chadwick, O.A., and Hilinski, T.E. (1998) The effect of plants on mineral weathering. *Biogeochemistry* **42**: 21–53.
- Kelly, L.C., Colin, Y., Turpault, M.-P., and Uroz, S. (2016) Mineral type and solution chemistry affect the structure and composition of actively growing bacterial communities as revealed by bromodeoxyuridine immunocapture and 16S rRNA pyrosequencing. *Microb Ecol* **72**: 428–442.
- Khan, A.A., Jilani, G., Akhtar, M.S., Saqlan, S.M., and Rasheed, M. (2009) Phosphorus solubilizing bacteria: occurrence, mechanisms and their role in crop production. **1**: 48–58.
- Klemm, P. and Schembri, M.A. (2000) Bacterial adhesins: function and structure. *Int J Med Microbiol* **290**: 27–35.
- Koele, N., Turpault, M.-P., Hildebrand, E.E., Uroz, S., and Frey-Klett, P. (2009) Interactions between mycorrhizal fungi and mycorrhizosphere bacteria during mineral weathering: Budget analysis and bacterial quantification. *Soil Biol Biochem* **41**: 1935–1942.
- Koerner, W., Dambrine, E., Dupouey, J.L., and Benoît, M. (1999) $\delta^{15}\text{N}$ of forest soil and understorey vegetation reflect the former agricultural land use. *Oecologia* **121**: 421–425.
- Kraemer, S.M. (2004) Iron oxide dissolution and solubility in the presence of siderophores. *Aquat Sci - Res Boundaries* **66**: 3–18.
- Kundu, B.S. and Gaur, A.C. (1980) Establishment of nitrogen-fixing and phosphate-solubilising bacteria in rhizosphere and their effect on yield and nutrient uptake of wheat crop. *Plant Soil* **57**: 223–230.
- Kundu, B.S. and Gaur, A.C. (1984) Rice response to inoculation with N₂-fixing and P-solubilizing microorganisms. *Plant Soil* **79**: 227–234.
- Lamérand, C., Shirokova, L.S., Bénézech, P., Rols, J.-L., and Pokrovsky, O.S. (2020) Olivine dissolution and hydrous Mg carbonate and silicate precipitation in the presence of microbial consortium of photo-autotrophic and heterotrophic bacteria. *Geochim Cosmochim Acta* **268**: 123–141.
- Landeweert, R., Hoffland, E., Finlay, R.D., Kuyper, T.W., and van Breemen, N. (2001) Linking plants to rocks: ectomycorrhizal fungi mobilize nutrients from minerals. *Trends Ecol Evol* **16**: 248–254.
- Laursen, J.B. and Nielsen, J. (2004) Phenazine natural products: biosynthesis, synthetic analogues, and biological activity. *Chem Rev* **104**: 1663–1686.

- Lee, S.D. (2018) *Collimonas antrihumi* sp. nov., isolated from a natural cave and emended description of the genus *Collimonas*. *Int J Syst Evol Microbiol* **68**: 2448–2453.
- Lepleux, C., Uroz, S., Collignon, C., Churin, J.-L., Turpault, M.-P., and Frey-Klett, P. (2013) A short-term mineral amendment impacts the mineral weathering bacterial communities in an acidic forest soil. *Res Microbiol* **164**: 729–739.
- Lepp, N.W. ed. (1981) Effect of heavy metal pollution on plants: Effects of trace metals on plant function, Liverpool, UK: springer science & Business Media.
- Lequy, É., Conil, S., and Turpault, M.-P. (2012) Impacts of Aeolian dust deposition on European forest sustainability: A review. *For Ecol Manag* **267**: 240–252.
- LeTourneau, M.K., Marshall, M.J., Cliff, J.B., Bonsall, R.F., Dohnalkova, A.C., Mavrodi, D.V., et al. (2018) Phenazine-1-carboxylic acid and soil moisture influence biofilm development and turnover of rhizobacterial biomass on wheat root surfaces. *Environ Microbiol* **20**: 2178–2194.
- LeTourneau, M.K., Marshall, M.J., Grant, M., Freeze, P.M., Strawn, D.G., Lai, B., et al. (2019) Phenazine-1-carboxylic acid-producing bacteria enhance the reactivity of iron minerals in dryland and irrigated wheat rhizospheres. *Environ Sci Technol* **53**: 14273–14284.
- Leveau, J.H.J. and Preston, G.M. (2008) Bacterial mycophagy: definition and diagnosis of a unique bacterial–fungal interaction. *New Phytol* **177**: 859–876.
- Leveau, J.H.J., Uroz, S., and de Boer, W. (2010) The bacterial genus *Collimonas* : mycophagy, weathering and other adaptive solutions to life in oligotrophic soil environments. *Environ Microbiol* **12**: 281–292.
- Levy, M. (1995) International co-operation to combat acid rain. *Green Globe Yearb 1995* 59–68.
- Leyval, C. and Berthelin, J. (1989) Interactions between *Laccaria laccata*, *Agrobacterium radiobacter* and beech roots: Influence on P, K, Mg, and Fe mobilization from minerals and plant growth. *Plant Soil* **117**: 103–110.
- Leyval, C., Laheurte, F., Belgy, G., and Berthelin, J. (1990) Weathering of micas in the rhizospheres of maize, pine and beech seedlings influenced by mycorrhizal and bacterial inoculation. *Symbiosis Rehovot* **9**: 105–109.
- Li, H. and Durbin, R. (2009) Fast and accurate short read alignment with Burrows–Wheeler transform. *Bioinformatics* **25**: 1754–1760.
- Li, Q. and Sand, W. (2017) Mechanical and chemical studies on EPS from *Sulfobacillus thermosulfidooxidans* : from planktonic to biofilm cells. *Colloids Surf B Biointerfaces* **153**: 34–40.
- Lidbury, I.D.E.A., Murphy, A.R.J., Scanlan, D.J., Bending, G.D., Jones, A.M.E., Moore, J.D., et al. (2016) Comparative genomic, proteomic and exoproteomic analyses of three *Pseudomonas* strains reveals novel insights into the phosphorus scavenging capabilities of soil bacteria. *Environ Microbiol* **18**: 3535–3549.
- Liermann, L.J., Kalinowski, B.E., Brantley, S.L., and Ferry, J.G. (2000) Role of bacterial siderophores in dissolution of hornblende. *Geochim Cosmochim Acta* **64**: 587–602.
- Lin, H. (2010) Earth’s Critical Zone and hydrogeology: concepts, characteristics, and advances. *Hydrol Earth Syst Sci* 21.
- Lin, Q., Wang, Y., Yang, X., Ruan, D., Wang, S., Wei, X., and Qiu, R. (2018) Effect of low-molecular-weight organic acids on hematite dissolution promoted by desferrioxamine B. *Environ Sci Pollut Res* **25**: 163–173.
- Liu, C., Mou, L., Yi, J., Wang, J., Liu, A., and Yu, J. (2019) The *eno* gene of *Burkholderia cenocepacia* strain 71-2 is involved in phosphate solubilization. *Curr Microbiol* **76**: 495–502.
- Liu, D., Lian, B., and Dong, H. (2012) Isolation of *Paenibacillus* sp. and assessment of its potential for enhancing mineral weathering. *Geomicrobiol J* **29**: 413–421.

- Liu, D., Lian, B., Wang, B., and Jiang, G. (2011) Degradation of potassium rock by earthworms and responses of bacterial communities in its gut and surrounding substrates after being fed with mineral. *PLOS ONE* **6**: e28803.
- Liu, H., Liu, X., Li, X., Fu, Z., and Lian, B. (2021) The molecular regulatory mechanisms of the bacteria involved in serpentine weathering coupled with carbonation. *Chem Geol* **565**: 120069.
- Liu, S.T., Lee, L.Y., Tai, C.Y., Hung, C.H., Chang, Y.S., Wolfram, J.H., et al. (1992) Cloning of an *Erwinia herbicola* gene necessary for gluconic acid production and enhanced mineral phosphate solubilization in *Escherichia coli* HB101: nucleotide sequence and probable involvement in biosynthesis of the coenzyme pyrroloquinoline quinone. *J Bacteriol* **174**: 5814–5819.
- Liu, W., Xu, X., Wu, X., Yang, Q., Luo, Y., and Christie, P. (2006) Decomposition of silicate minerals by *Bacillus mucilaginosus* in liquid culture. *Environ Geochem Health* **28**: 133–140.
- Lottmann, J., O’Callaghan, M., Baird, D., and Walter, C. (2010) Bacterial and fungal communities in the rhizosphere of field-grown genetically modified pine trees (*Pinus radiata* D.). *Environ Biosafety Res* **9**: 25–40.
- Love, M.I., Huber, W., and Anders, S. (2014) Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2. *Genome Biol* **15**: 1–21.
- Ludueña, L.M., Anzuay, M.S., Magallanes-Noguera, C., Tonelli, M.L., Ibañez, F.J., Angelini, J.G., et al. (2017) Effects of P limitation and molecules from peanut root exudates on *pqqE* gene expression and *pqq* promoter activity in the phosphate-solubilizing strain *Serratia* sp. S119. *Res Microbiol* **168**: 710–721.
- Lunsdorf, Erb, Abraham, and Timmis (2000) “Clay hutchies”: a novel interaction between bacteria and clay minerals. *Environ Microbiol* **2**: 161–168.
- Lüttge, A. and Conrad, P.G. (2004) Direct observation of microbial inhibition of calcite dissolution. *Appl Environ Microbiol* **70**: 1627–1632.
- Lynch, J.M. and de Leij, F. (2012) Rhizosphere. In *eLS*. John Wiley & Sons, Ltd (ed). Chichester, UK: John Wiley & Sons, Ltd.
- Lynch, J.M. and Whipps, J.M. (1990) Substrate flow in the rhizosphere. *Plant Soil* **129**: 1–10.
- Madé, B. (1991) Modélisation thermodynamique et cinétique des réactions géochimiques dans les interactions eau-roche.
- Mailloux, B.J., Alexandrova, E., Keimowitz, A.R., Wovkulich, K., Freyer, G.A., Herron, M., et al. (2009) Microbial mineral weathering for nutrient acquisition releases arsenic. *Appl Environ Microbiol* **75**: 2558–2565.
- Mander, C., Wakelin, S., Young, S., Condrón, L., and O’Callaghan, M. (2012) Incidence and diversity of phosphate-solubilising bacteria are linked to phosphorus status in grassland soils. *Soil Biol Biochem* **44**: 93–101.
- Männistö, M.K. and Häggblom, M.M. (2006) Characterization of psychrotolerant heterotrophic bacteria from Finnish Lapland. *Syst Appl Microbiol* **29**: 229–243.
- Männistö, M.K., Tirola, M., and Häggblom, M.M. (2007) Bacterial communities in Arctic fjelds of Finnish Lapland are stable but highly pH-dependent: Bacterial communities in Arctic fjelds of Finnish Lapland. *FEMS Microbiol Ecol* **59**: 452–465.
- Margalef, O., Sardans, J., Fernández-Martínez, M., Molowny-Horas, R., Janssens, I.A., Ciais, P., et al. (2017) Global patterns of phosphatase activity in natural soils. *Sci Rep* **7**: 1337.
- Mariotti, B., Hoshika, Y., Cambi, M., Marra, E., Feng, Z., Paoletti, E., and Marchi, E. (2020) Vehicle-induced compaction of forest soil affects plant morphological and physiological attributes: A meta-analysis. *For Ecol Manag* **462**: 118004.

- Marschner, H., Häussling, M., and George, E. (1991) Ammonium and nitrate uptake rates and rhizosphere pH in non-mycorrhizal roots of Norway spruce [*Picea abies* (L.) Karst.]. *Trees* **5**: 14–21.
- Martin, F., Kohler, A., Murat, C., Veneault-Fourrey, C., and Hibbett, D.S. (2016) Unearthing the roots of ectomycorrhizal symbioses. *Nat Rev Microbiol* **14**: 760–773.
- Martins da Costa, E., de Lima, W., Oliveira-Longatti, S.M., and de Souza, F.M. (2015) Phosphate-solubilising bacteria enhance *Oryza sativa* growth and nutrient accumulation in an oxisol fertilized with rock phosphate. *Ecol Eng* **83**: 380–385.
- Mathew, A., Eberl, L., and Carlier, A.L. (2014) A novel siderophore-independent strategy of iron uptake in the genus *Burkholderia*: Siderophore-independent iron uptake in *Burkholderia*. *Mol Microbiol* **91**: 805–820.
- Matsuoka, N. and Murton, J. (2008) Frost weathering: recent advances and future directions. *Permafrost Periglacial Process* **19**: 195–210.
- Mavrodi, D.V., Ksenzenko, V.N., Bonsall, R.F., Cook, R.J., Boronin, A.M., and Thomashow, L.S. (1998) A seven-gene locus for synthesis of phenazine-1-carboxylic acid by *Pseudomonas fluorescens* 2-79. *J Bacteriol* **180**: 2541–2548.
- Mavrodi, O.V., Mavrodi, D.V., Park, A.A., Weller, D.M., and Thomashow, L.S. (2006) The role of *dsbA* in colonization of the wheat rhizosphere by *Pseudomonas fluorescens* Q8r1-96. *Microbiology* **152**: 863–872.
- McGrath, M.J., Luysaert, S., Meyfroidt, P., Kaplan, J.O., Bürgi, M., Chen, Y., et al. (2015) Reconstructing European forest management from 1600 to 2010. *Biogeosciences* **12**: 4291–4316.
- McHargue, J.S. (1926) Manganese and plant growth. *Ind Eng Chem* **18**: 172–175.
- Medeiros, P.M., Fernandes, M.F., Dick, R.P., and Simoneit, B.R.T. (2006) Seasonal variations in sugar contents and microbial community in a ryegrass soil. *Chemosphere* **65**: 832–839.
- Mehnert, M., Retamal-Morales, G., Schwabe, R., Vater, S., Heine, T., Levicán, G.J., et al. (2017) Revisiting the Chrome Azurol S assay for various metal ions. *Solid State Phenom* **262**: 509–512.
- Mela, F., Fritsche, K., de Boer, W., van den Berg, M., van Veen, J.A., Maharaj, N.N., and Leveau, J.H.J. (2012) Comparative genomics of bacteria from the genus *Collimonas*: linking (dis)similarities in gene content to phenotypic variation and conservation: *Collimonas* comparative genomics. *Environ Microbiol Rep* **4**: 424–432.
- Meunier, A. (2005) *Clays*, Springer Science & Business Media.
- Miller, S.H., Browne, P., Prigent-Combaret, C., Combes-Meynet, E., Morrissey, J.P., and O’Gara, F. (2010) Biochemical and genomic comparison of inorganic phosphate solubilization in *Pseudomonas* species: Inorganic P-solubilization in *Pseudomonas*. *Environ Microbiol Rep* **2**: 403–411.
- Moghimi, A. and Tate, M.E. (1978) Does 2-ketogluconate chelate calcium in the pH range 2.4 to 6.4? *Soil Biol Biochem* **10**: 289–292.
- Morton, A.C. (1984) Stability of detrital heavy minerals in Tertiary sandstones from the North Sea Basin. *Clay Miner* **19**: 287–308.
- Mosbach, K. (1973) Biosynthesis of lichen substances. In *The Lichens*. Elsevier, pp. 523–546.
- Mottershead, D.N., Baily, B., Collier, P., and Inkpen, R.J. (2003) Identification and quantification of weathering by plant roots. *Build Environ* **38**: 1235–1241.
- Nahas, E. (1996) Factors determining rock phosphate solubilization by microorganisms isolated from soil. *World J Microbiol Biotechnol* **12**: 567–572.
- Napieralski, S.A., Buss, H.L., Brantley, S.L., Lee, S., Xu, H., and Roden, E.E. (2019) Microbial chemolithotrophy mediates oxidative weathering of granitic bedrock. *Proc Natl Acad Sci* **116**: 26394–26401.

- Nautiyal, C.S., Bhadauria, S., Kumar, P., Lal, H., Mondal, R., and Verma, D. (2000) Stress induced phosphate solubilization in bacteria isolated from alkaline soils. *FEMS Microbiol Lett* **182**: 291–296.
- Nazir, R., Warmink, J.A., Voordes, D.C., van de Bovenkamp, H.H., and van Elsas, J.D. (2013) Inhibition of mushroom formation and induction of glycerol release-ecological strategies of *Burkholderia terrae* BS001 to create a hospitable niche at the fungus *Lyophyllum* sp. strain Karsten. *Microb Ecol* **65**: 245–254.
- Newman, D.K. (2001) How bacteria respire minerals. *Science* **292**: 1312–1313.
- Nicolitch, O., Colin, Y., Turpault, M.-P., Fauchery, L., and Uroz, S. (2017) Tree roots select specific bacterial communities in the subsurface critical zone. *Soil Biol Biochem* **115**: 109–123.
- Nicolitch, O., Colin, Y., Turpault, M.-P., and Uroz, S. (2016) Soil type determines the distribution of nutrient mobilizing bacterial communities in the rhizosphere of beech trees. *Soil Biol Biochem* **103**: 429–445.
- Nicolitch, O., Feucherolles, M., Churin, J.-L., Fauchery, L., Turpault, M.-P., and Uroz, S. (2019) A microcosm approach highlights the response of soil mineral weathering bacterial communities to an increase of K and Mg availability. *Sci Rep* **9**: 14403.
- Nogueira, J., Evangelista, H., Valeriano, C. de M., Sifeddine, A., Neto, C., Vaz, G., et al. (2021) Dust arriving in the Amazon basin over the past 7,500 years came from diverse sources. *Commun Earth Environ* **2**: 1–11.
- Noinaj, N., Guillier, M., Barnard, T.J., and Buchanan, S.K. (2010) TonB-dependent transporters: regulation, structure, and function. *Annu Rev Microbiol* **64**: 43–60.
- Oburger, E., Jones, D.L., and Wenzel, W.W. (2011) Phosphorus saturation and pH differentially regulate the efficiency of organic acid anion-mediated P solubilization mechanisms in soil. *Plant Soil* **341**: 363–382.
- Ochsner, U.A., Wilderman, P.J., Vasil, A.I., and Vasil, M.L. (2002) GeneChip® expression analysis of the iron starvation response in *Pseudomonas aeruginosa*: identification of novel pyoverdine biosynthesis genes: GeneChip® expression analysis of iron starvation. *Mol Microbiol* **45**: 1277–1287.
- Olsson, B.A., Bengtsson, J., and Lundkvist, H. (1996) Effects of different forest harvest intensities on the pools of exchangeable cations in coniferous forest soils. *For Ecol Manag* **84**: 135–147.
- Olsson-Francis, K., Van Houdt, R., Mergeay, M., Leys, N., and Cockell, C.S. (2010) Microarray analysis of a microbe-mineral interaction: Analysis of a microbe-mineral interaction. *Geobiology* **8**: 446–456.
- Opelt, K. and Berg, G. (2004) Diversity and antagonistic potential of bacteria associated with bryophytes from nutrient-poor habitats of the Baltic sea coast. *Appl Environ Microbiol* **70**: 6569–6579.
- O'Toole, G.A. and Kolter, R. (1998) Flagellar and twitching motility are necessary for *Pseudomonas aeruginosa* biofilm development. *Mol Microbiol* **30**: 295–304.
- Ovington, J.D. (1962) Quantitative ecology and the woodland ecosystem concept. In *Advances in Ecological Research*. Elsevier, pp. 103–192.
- Palmer, T. and Berks, B.C. (2012) The twin-arginine translocation (Tat) protein export pathway. *Nat Rev Microbiol* **10**: 483–496.
- Paris, F., Botton, B., and Lapeyrie, F. (1996) *In vitro* weathering of phlogopite by ectomycorrhizal fungi: II. Effect of K⁺ and Mg²⁺ deficiency and N sources on accumulation of oxalate and H⁺. *Plant Soil* **179**: 141–150.
- Parker, D.L., Sposito, G., and Tebo, B.M. (2004) Manganese(III) binding to a pyoverdine siderophore produced by a manganese(II)-oxidizing bacterium. *Geochim Cosmochim Acta* **68**: 4809–4820.

- Parrello, D., Zegeye, A., Mustin, C., and Billard, P. (2016) Siderophore-mediated iron dissolution from nontronites is controlled by mineral crystallochemistry. *Front Microbiol* **7**: 423.
- Patel, D.K., Archana, G., and Kumar, G.N. (2008) Variation in the nature of organic acid secretion and mineral phosphate solubilization by *Citrobacter* sp. DHRSS in the presence of different sugars. *Curr Microbiol* **56**: 168–174.
- Patel, P.R., Shaikh, S.S., and Sayyed, R.Z. (2018) Modified chrome azurol S method for detection and estimation of siderophores having affinity for metal ions other than iron. *Environ Sustain* **1**: 81–87.
- Peekhaus, N. and Conway, T. (1998) What's for dinner?: Entner-Doudoroff metabolism in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **180**: 3495–3502.
- Perez, A., Rossano, S., Trcera, N., Verney-Carron, A., Huguenot, D., van Hullebusch, E.D., et al. (2015) Impact of iron chelators on short-term dissolution of basaltic glass. *Geochim Cosmochim Acta* **162**: 83–98.
- Perez, A., Rossano, S., Trcera, N., Verney-Carron, A., Rommevaux, C., Fourdrin, C., et al. (2019) Direct and indirect impact of the bacterial strain *Pseudomonas aeruginosa* on the dissolution of synthetic Fe(III)- and Fe(II)-bearing basaltic glasses. *Chem Geol* **523**: 9–18.
- Perlin, J. (2005) A forest journey: The story of wood and civilization, The Countryman Press.
- Phillips, J.D. (2010) The convenient fiction of steady-state soil thickness. *Geoderma* **156**: 389–398.
- Picard, L., Oger, P., Turpault, M.-P., and Uroz, S. (2020) Draft genome sequence of *Collimonas pratensis* strain PMB3(1), an effective mineral-weathering and chitin-hydrolyzing bacterial strain. *Microbiol Resour Announc* **9**: e00601-20.
- Picard, L., Paris, C., Dhalleine, T., Morin, E., Oger, P., Turpault, M., and Uroz, S. (2021b) The mineral weathering ability of *Collimonas pratensis* PMB3(1) involves a Malleobactin-mediated iron acquisition system. *Environ Microbiol*.
- Picard, L., Turpault, M.-P., Oger, P.M., and Uroz, S. (2021a) Identification of a novel type of glucose dehydrogenase involved in the mineral weathering ability of *Collimonas pratensis* strain PMB3(1). *FEMS Microbiol Ecol* **97**: fiae232.
- Pierson, L.S. and Pierson, E.A. (2010) Metabolism and function of phenazines in bacteria: impacts on the behavior of bacteria in the environment and biotechnological processes. *Appl Microbiol Biotechnol* **86**: 1659–1670.
- Ponder, F., Fleming, R.L., Berch, S., Busse, M.D., Elioff, J.D., Hazlett, P.W., et al. (2012) Effects of organic matter removal, soil compaction and vegetation control on 10th year biomass and foliar nutrition: LTSP continent-wide comparisons. *For Ecol Manag* **278**: 35–54.
- Postma, J., Schilder, M.T., Bloem, J., and van Leeuwen-Haagsma, W.K. (2008) Soil suppressiveness and functional diversity of the soil microflora in organic farming systems. *Soil Biol Biochem* **40**: 2394–2406.
- Program (U.S.) (1993) National acid precipitation assessment program: 1992 Report to congress.
- Puente, M.E., Bashan, Y., Li, C.Y., and Lebsky, V.K. (2004) Microbial populations and activities in the rhizoplane of rock-weathering desert plants. II. Growth promotion of cactus seedlings. *Plant Biol* **6**: 643–649.
- Rajapaksha, C.P. and Senanayake, A.P. (2011) Potential use of rock-phosphate-solubilizing bacteria associated with wild rice as inoculants for improved rice (*Oryza sativa*). *Arch Agron Soil Sci* **57**: 775–788.

- Rajawat, M.V.S., Singh, R., Singh, D., and Kumar Saxena, A. (2019) Buffering reduces potassium solubilising potential of selected bacterial isolates. *Biosci Biotechnol Res Asia* **16**: 19–25.
- Rangel-Castro, J.I., Danell, E., and Pfeffer, P.E. (2002) A ¹³C-NMR study of exudation and storage of carbohydrates and amino acids in the ectomycorrhizal edible mushroom *Cantharellus cibarius*. *Mycologia* **94**: 190–199.
- Ranger, J. (2001) Les sols forestiers (Forest soils). *Bull Assoc Géographes Fr* **78**: 119–134.
- Ranger, J., Marques, R., Colin-Belgrand, M., Flammang, N., and Gelhaye, D. (1995) The dynamics of biomass and nutrient accumulation in a Douglas-fir (*Pseudotsuga menziesii* Franco) stand studied using a chronosequence approach. *For Ecol Manag* **72**: 167–183.
- Ranger, J. and Nys, Cl. (2003) La qualité des sols forestiers français. *Étude Gest Sols* **10**: 24.
- Ranger, J. and Turpault, M.-P. (1999) Input–output nutrient budgets as a diagnostic tool for sustainable forest management. *For Ecol Manag* **122**: 139–154.
- Rao, M.A., Violante, A., and Gianfreda, L. (2000) Interaction of acid phosphatase with clays, organic molecules and organo-mineral complexes: kinetics and stability. *Soil Biol Biochem* **32**: 1007–1014.
- Rapti, S., Boyatzis, S.C., Rivers, S., and Pournou, A. (2021) Siderophores and their applications in wood, textile, and paper conservation. In *Microorganisms in the Deterioration and Preservation of Cultural Heritage*. Joseph, E. (ed). Cham: Springer International Publishing, pp. 301–339.
- Reichard, P.U., Kraemer, S.M., Frazier, S.W., and Kretzschmar, R. (2005) Goethite dissolution in the presence of phytosiderophores: rates, mechanisms, and the synergistic effect of oxalate. *Plant Soil* **276**: 115–132.
- Reichard, P.U., Kretzschmar, R., and Kraemer, S.M. (2007) Dissolution mechanisms of goethite in the presence of siderophores and organic acids. *Geochim Cosmochim Acta* **71**: 5635–5650.
- Reid, I.D. (1995) Biodegradation of lignin. *Can J Bot* **73**: 1011–1018.
- Reid, S.J. and Abratt, V.R. (2005) Sucrose utilisation in bacteria: genetic organisation and regulation. *Appl Microbiol Biotechnol* **67**: 312–321.
- Reimann, C., Serino, L., Beyeler, M., and Haas, D. (1998) Dihydroaeruginosic acid synthetase and pyochelin synthetase, products of the *pchEF* genes, are induced by extracellular pyochelin in *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbiology* **144**: 3135–3148.
- Reyes, I., Valery, A., and Valduz, Z. (2006) Phosphate-solubilizing microorganisms isolated from rhizospheric and bulk soils of colonizer plants at an abandoned rock phosphate mine. *First Int Meet Microb Phosphate Solubilization Springer Dordr* 69–75.
- Ribeiro, I.D.A., Volpiano, C.G., Vargas, L.K., Granada, C.E., Lisboa, B.B., and Passaglia, L.M.P. (2020) Use of mineral weathering bacteria to enhance nutrient availability in crops: a review. *Front Plant Sci* **11**: 2047.
- Richardson, I.W. and Anthony, C. (1992) Characterization of mutant forms of the quinoprotein methanol dehydrogenase lacking an essential calcium ion. *Biochem J* **287**: 709–715.
- Robert, M. and Berthelin, J. (1986) Role of biological and biochemical factors in soil mineral weathering. In *SSSA Special Publications*. Huang, P.M. and Schnitzer, M. (eds). Madison, WI, USA: Soil Science Society of America, pp. 453–495.
- Rohart, F., Gautier, B., Singh, A., and Cao, K.-A.L. (2017) mixOmics: An R package for ‘omics feature selection and multiple data integration. *PLOS Comput Biol* **13**: e1005752.
- Rowley, D.L. and Wolf, R.E. (1991) Molecular characterization of the *Escherichia coli* K-12 *zwf* gene encoding glucose 6-phosphate dehydrogenase. *J Bacteriol* **173**: 968–977.
- Rüger, H.-J. and Krambeck, H.-J. (1994) Evaluation of the BIOLOG substrate metabolism system for classification of marine bacteria. *Syst Appl Microbiol* **17**: 281–288.

- Ruhal, R., Kataria, R., and Choudhury, B. (2013) Trends in bacterial trehalose metabolism and significant nodes of metabolic pathway in the direction of trehalose accumulation. *Microb Biotechnol* **6**: 493–502.
- Saiz-Jimenez, C. (1999) Biogeochemistry of weathering processes in monuments. *Geomicrobiol J* **16**: 27–37.
- Sanyal, S.K., Dwivedi, B.S., Singh, V.K., Majumdar, K., Datta, S.C., Pattanayak, S.K., and Annapurna, K. (2015) Phosphorus in relation to dominant cropping sequences in India: chemistry, fertility relations and management options. *Curr Sci* **108**: 1262–1270.
- Sas, L., Rengel, Z., and Tang, C. (2001) Excess cation uptake, and extrusion of protons and organic acid anions by *Lupinus albus* under phosphorus deficiency. *Plant Sci* **160**: 1191–1198.
- Sashidhar, B. and Podile, A.R. (2010) Mineral phosphate solubilization by rhizosphere bacteria and scope for manipulation of the direct oxidation pathway involving glucose dehydrogenase. *J Appl Microbiol* **109**: 1–12.
- Sashidhar, B. and Podile, A.R. (2009) Transgenic expression of glucose dehydrogenase in *Azotobacter vinelandii* enhances mineral phosphate solubilization and growth of sorghum seedlings. *Microb Biotechnol* **2**: 521–529.
- Sasnow, S.S., Wei, H., and Aristilde, L. (2016) Bypasses in intracellular glucose metabolism in iron-limited *Pseudomonas putida*. *MicrobiologyOpen* **5**: 3–20.
- Sawhney, B.L. (1958) Aluminium interlayers in soil clay minerals, montmorillonite and vermiculite. *Nature* **182**: 1595–1596.
- Schmalenberger, A., Duran, A.L., Bray, A.W., Bridge, J., Bonneville, S., Benning, L.G., et al. (2015) Oxalate secretion by ectomycorrhizal *Paxillus involutus* is mineral-specific and controls calcium weathering from minerals. *Sci Rep* **5**: 1–14.
- Schmidt, M., Priemé, A., and Stougaard, P. (2006) Bacterial diversity in permanently cold and alkaline ikaite columns from Greenland. *Extremophiles* **10**: 551–562.
- Schueler, T.A., Dourado, M.L., Videira, S.S., da Cunha, C.D., and Rizzo, A.C.L. (2021) Biosolubilization of verdete: An alternative potassium source for agriculture fertilizer. *Biocatal Agric Biotechnol* **34**: 102031.
- Schwertmann, U. (1991) Solubility and dissolution of iron oxides. *Plant Soil* **130**: 1–25.
- Schwyn, B. and Neilands, J.B. (1987) Universal chemical assay for the detection and determination of siderophores. *Anal Biochem* **160**: 47–56.
- Selvakumar, G., Joshi, P., Suyal, P., Mishra, P.K., Joshi, G.K., Venugopalan, R., et al. (2013) Rock phosphate solubilization by psychrotolerant *Pseudomonas* spp. and their effect on lentil growth and nutrient uptake under polyhouse conditions. *Ann Microbiol* **63**: 1353–1362.
- Senechkin, I.V., Speksnijder, A.G.C.L., Semenov, A.M., van Bruggen, A.H.C., and van Overbeek, L.S. (2010) Isolation and partial characterization of bacterial strains on low organic carbon medium from soils fertilized with different organic amendments. *Microb Ecol* **60**: 829–839.
- Sharma, S.B., Sayyed, R.Z., Trivedi, M.H., and Gobi, T.A. (2013) Phosphate solubilizing microbes: sustainable approach for managing phosphorus deficiency in agricultural soils. *SpringerPlus* **2**: 1–14.
- Shen, Y.-Q., Bonnot, F., Imsand, E.M., RoseFigura, J.M., Sjölander, K., and Klinman, J.P. (2012) Distribution and properties of the genes encoding the biosynthesis of the bacterial cofactor, pyrroloquinoline quinone. *Biochemistry* **51**: 2265–2275.
- Shenker, M., Chen, Y., and Hadar, Y. (1996) Stability constants of the fungal siderophore rhizoferrin with various microelements and calcium. *Soil Sci Soc Am J* **60**: 1140–1144.

- Shi, L., Dong, H., Reguera, G., Beyenal, H., Lu, A., Liu, J., et al. (2016) Extracellular electron transfer mechanisms between microorganisms and minerals. *Nat Rev Microbiol* **14**: 651–662.
- Sidhu, P.S. (1981) Dissolution of iron oxides and oxyhydroxides in hydrochloric and perchloric acids. *Clays Clay Miner* **29**: 269–276.
- Siebner-Freibach, H., Hadar, Y., Yariv, S., Lapidés, I., and Chen, Y. (2006) Thermospectroscopic study of the adsorption mechanism of the hydroxamic siderophore ferrioxamine B by calcium montmorillonite. *J Agric Food Chem* **54**: 1399–1408.
- Silva, I.N., Ramires, M.J., Azevedo, L.A., Guerreiro, A.R., Tavares, A.C., Becker, J.D., and Moreira, L.M. (2017) Regulator LdhR and D-lactate dehydrogenase LdhA of *Burkholderia multivorans* play roles in carbon overflow and in planktonic cellular aggregate formation. *Appl Environ Microbiol* **83**: e01343-17.
- Silver, S. (1983) Bacterial Interactions with Mineral Cations and Anions: Good Ions and Bad. In *Bio-mineralization and biological metal accumulation*. Westbroek, P. and de Jong, E.W. (eds). Dordrecht: Springer, pp. 439–457.
- Singh, N., Karpichev, Y., Sharma, R., Gupta, B., Sahu, A.K., Satnami, M.L., and Ghosh, K.K. (2015) From α -nucleophiles to functionalized aggregates: exploring the reactivity of hydroxamate ion towards esterolytic reactions in micelles. *Org Biomol Chem* **13**: 2827–2848.
- Skylberg, U. (1999) pH and solubility of aluminium in acidic forest soils: a consequence of reactions between organic acidity and aluminium alkalinity. *Eur J Soil Sci* **50**: 95–106.
- Song, C., Schmidt, R., de Jager, V., Krzyzanowska, D., Jongedijk, E., Cankar, K., et al. (2015) Exploring the genomic traits of fungus-feeding bacterial genus *Collimonas*. *BMC Genomics* **16**: 1103–1120.
- Song, J., Zhao, F.-J., McGrath, S.P., and Luo, Y.-M. (2006) Influence of soil properties and aging on arsenic phytotoxicity. *Environ Toxicol Chem Int J* **25**: 1663–1670.
- Stevenson, G., Andrianopoulos, K., Hobbs, M., and Reeves, P.R. (1996) Organization of the *Escherichia coli* K-12 gene cluster responsible for production of the extracellular polysaccharide colanic acid. *J Bacteriol* **178**: 4885–4893.
- Stiefel, A., Mahren, S., Ochs, M., Schindler, P.T., Enz, S., and Braun, V. (2001) Control of the ferric citrate transport system of *Escherichia coli*: mutations in region 2.1 of the FecI extracytoplasmic-function sigma factor suppress mutations in the FecR transmembrane regulatory protein. *J Bacteriol* **183**: 162–170.
- Stranghoener, M., Schippers, A., Dultz, S., and Behrens, H. (2018) Experimental microbial alteration and Fe mobilization from basaltic rocks of the ICDP HSDP2 drill core, Hilo, Hawaii. *Front Microbiol* **9**: 1252.
- Strunz, H. and Nickel, E.H. (2001) Strunz mineralogical tables: chemical-structural mineral classification system, 9th ed. Stuttgart: Schweizerbart.
- Stucki, J.W. and Kostka, J.E. (2006) Microbial reduction of iron in smectite. *Comptes Rendus Geosci* **338**: 468–475.
- Suleman, M., Yasmin, S., Rasul, M., Yahya, M., Atta, B.M., and Mirza, M.S. (2018) Phosphate solubilizing bacteria with glucose dehydrogenase gene for phosphorus uptake and beneficial effects on wheat. *PLOS ONE* **13**: e0204408.
- Sützl, L., Foley, G., Gillam, E.M.J., Bodén, M., and Haltrich, D. (2019) The GMC superfamily of oxidoreductases revisited: analysis and evolution of fungal GMC oxidoreductases. *Biotechnol Biofuels* **12**: 1–18.
- Suzuki, Y., Matsubara, T., and Hoshino, M. (2003) Breakdown of mineral grains by earthworms and beetle larvae. *Geoderma* **112**: 131–142.

- Swift, R.S. (1996) Organic matter characterization. In *Methods of Soil Analysis*. John Wiley & Sons, Ltd, pp. 1011–1069.
- Taktek, S., Trépanier, M., Servin, P.M., St-Arnaud, M., Piché, Y., Fortin, J.-A., and Antoun, H. (2015) Trapping of phosphate solubilizing bacteria on hyphae of the arbuscular mycorrhizal fungus *Rhizophagus irregularis* DAOM 197198. *Soil Biol Biochem* **90**: 1–9.
- Tardieu, F. and Manichon, H. (1987) Etat structural, enracinement et alimentation hydrique du maïs. II. – Croissance et disposition spatiale du système racinaire. *Agronomie* **7**: 201–211.
- Teotia, P., Kumar, V., Kumar, M., Shrivastava, N., and Varma, A. (2016) Rhizosphere microbes: potassium solubilization and crop productivity—present and future aspects. In *Potassium solubilizing microorganisms for sustainable agriculture*. Meena, V.S., Maurya, B.R., Verma, J.P., and Meena, R.S. (eds). New Delhi: Springer, pp. 315–325.
- Tessier, L.F. (1910) Les sols forestiers d’après Mr E. Henry. *Ann Géographie* **19**: 70–74.
- Thomas, G.W. (1982) Exchangeable Cations. In *Agronomy Monographs*. Page, A.L. (ed). Madison, WI, USA: American Society of Agronomy, Soil Science Society of America, pp. 159–165.
- Timonen, S. and Marschner, P. (2006) Mycorrhizosphere Concept. In *Microbial Activity in the Rhizosphere*. Soil Biology. Mukerji, K.G., Manoharachary, C., and Singh, J. (eds). Berlin/Heidelberg: Springer-Verlag, pp. 155–172.
- Tomlinson, G.H. (2003) Acidic deposition, nutrient leaching and forest growth. *Biogeochemistry* **65**: 51–81.
- Tripura, C., Sudhakar Reddy, P., Reddy, M.K., Sashidhar, B., and Podile, A.R. (2007) Glucose dehydrogenase of a rhizobacterial strain of *Enterobacter asburiae* involved in mineral phosphate solubilization shares properties and sequence homology with other members of enterobacteriaceae. *Indian J Microbiol* **47**: 126–131.
- Tsurumaru, H., Okubo, T., Okazaki, K., Hashimoto, M., Kakizaki, K., Hanzawa, E., et al. (2015) Metagenomic analysis of the bacterial community associated with the taproot of sugar beet. *Microbes Environ* **30**: 63–69.
- Tsuya, T., Ferri, S., Fujikawa, M., Yamaoka, H., and Sode, K. (2006) Cloning and functional expression of glucose dehydrogenase complex of *Burkholderia cepacia* in *Escherichia coli*. *J Biotechnol* **123**: 127–136.
- Turpault, M.-P., Calvaruso, C., Dincher, M., Mohammed, G., Didier, S., Redon, P.-O., and Cochet, C. (2019) Contribution of carbonates and oxalates to the calcium cycle in three beech temperate forest ecosystems with contrasting soil calcium availability. *Biogeochemistry* **146**: 51–70.
- Turpault, M.-P., Nys, C., and Calvaruso, C. (2009) Rhizosphere impact on the dissolution of test minerals in a forest ecosystem. *Geoderma* **153**: 147–154.
- Uroz, S., Calvaruso, C., Turpault, M.-P., and Frey-Klett, P. (2009a) Mineral weathering by bacteria: ecology, actors and mechanisms. *Trends Microbiol* **17**: 378–387.
- Uroz, S., Calvaruso, C., Turpault, M.-P., Pierrat, J.C., Mustin, C., and Frey-Klett, P. (2007) Effect of the mycorrhizosphere on the genotypic and metabolic diversity of the bacterial communities involved in mineral weathering in a forest soil. *Appl Environ Microbiol* **73**: 3019–3027.
- Uroz, S., Calvaruso, C., Turpault, M.-P., Sarniguet, A., de Boer, W., Leveau, J.H.J., and Frey-Klett, P. (2009b) Efficient mineral weathering is a distinctive functional trait of the bacterial genus *Collimonas*. *Soil Biol Biochem* **41**: 2178–2186.
- Uroz, S. and Frey-Klett, P. (2011a) Linking diversity to function: highlight on the mineral weathering bacteria. *Open Life Sci* **6**: 817–820.

- Uroz, S., Kelly, L.C., Turpault, M.-P., Lepleux, C., and Frey-Klett, P. (2015) The mineralosphere concept: mineralogical control of the distribution and function of mineral-associated bacterial communities. *Trends Microbiol* **23**: 751–762.
- Uroz, S., Picard, L., Turpault, M., Auer, L., Armengaud, J., and Oger, P. (2020) Dual transcriptomics and proteomics analyses of the early stage of interaction between *Caballeronia mineralivorans* PML1(12) and mineral. *Environ Microbiol* **22**: 3838–3862.
- Uroz, S., Tech, J.J., Sawaya, N.A., Frey-Klett, P., and Leveau, J.H.J. (2014) Structure and function of bacterial communities in ageing soils: Insights from the Mendocino ecological staircase. *Soil Biol Biochem* **69**: 265–274.
- Uroz, S., Turpault, M.-P., Van Scholl, L., Palin, B., and Frey-Klett, P. (2011b) Long term impact of mineral amendment on the distribution of the mineral weathering associated bacterial communities from the beech *Scleroderma citrinum* ectomycorrhizosphere. *Soil Biol Biochem* **43**: 2275–2282.
- Vacheron, J., Desbrosses, G., Bouffaud, M.-L., Touraine, B., Moëgne-Loccoz, Y., Muller, D., et al. (2013) Plant growth-promoting rhizobacteria and root system functioning. *Front Plant Sci* **4**: 356.
- Valdés, J., Pedroso, I., Quatrini, R., Dodson, R.J., Tettelin, H., Blake, R., et al. (2008) *Acidithiobacillus ferrooxidans* metabolism: from genome sequence to industrial applications. *BMC Genomics* **9**: 1–24.
- Vallenet, D. (2006) MaGe: a microbial genome annotation system supported by synteny results. *Nucleic Acids Res* **34**: 53–65.
- Vallenet, D., Calteau, A., Dubois, M., Amours, P., Bazin, A., Beuvin, M., et al. (2020) MicroScope: an integrated platform for the annotation and exploration of microbial gene functions through genomic, pangenomic and metabolic comparative analysis. *Nucleic Acids Res* **48**: D579–D589.
- Vallenet, D., Engelen, S., Mornico, D., Cruveiller, S., Fleury, L., Lajus, A., et al. (2009) MicroScope: a platform for microbial genome annotation and comparative genomics. *Database* **2009**: bap021.
- Vanaporn, M. and Titball, R.W. (2020) Trehalose and bacterial virulence. *Virulence* **11**: 1192–1202.
- Vargas-Straube, M.J., Cámara, B., Tello, M., Montero-Silva, F., Cárdenas, F., and Seeger, M. (2016) Genetic and functional analysis of the biosynthesis of a Non-Ribosomal Peptide Siderophore in *Burkholderia xenovorans* LB400. *PLOS ONE* **11**: e0151273.
- Vazquez, P., Holguin, G., Puente, M.E., Lopez-Cortes, A., and Bashan, Y. (2000) Phosphate-solubilizing microorganisms associated with the rhizosphere of mangroves in a semiarid coastal lagoon. *Biol Fertil Soils* **30**: 460–468.
- Velbel, M.A. (1999) Bond strength and the relative weathering rates of simple orthosilicates. *Am J Sci* **299**: 679–696.
- Vicente, M.A., Razzaghe, M., and Robert, M. (1977) Formation of aluminium hydroxy vermiculite (intergrade) and smectite from mica under acidic conditions. *Clay Miner* **12**: 101–112.
- Wagh, Jitendra, Bhandari, P., Shah, S., Archana, G., and Kumar, G.N. (2014) Overexpression of citrate operon in *Herbaspirillum seropedicae* Z67 enhances organic acid secretion, mineral phosphate solubilization and growth promotion of *Oryza sativa*. *Plant Soil* **383**: 73–86.
- Wagh, J., Shah, S., Bhandari, P., Archana, G., and Kumar, G.N. (2014) Heterologous expression of pyrroloquinoline quinone (pqq) gene cluster confers mineral phosphate solubilization ability to *Herbaspirillum seropedicae* Z67. *Appl Microbiol Biotechnol* **98**: 5117–5129.

- Wallander, H. (2000a) Uptake of P from apatite by *Pinus sylvestris* seedlings colonised by different ectomycorrhizal fungi. *Plant Soil* **218**: 249–256.
- Wallander, H. (2000b) Use of strontium isotopes and foliar K content to estimate weathering of biotite induced by pine seedlings colonised by ectomycorrhizal fungi from two different soils. *Plant Soil* **222**: 215–229.
- Wallander, H. and Hagerberg, D. (2004) Do ectomycorrhizal fungi have a significant role in weathering of minerals in forest soil? *Symbiosis* **37**: 249–257.
- Wallander, H. and Wickman, T. (1999) Biotite and microcline as potassium sources in ectomycorrhizal and non-mycorrhizal *Pinus sylvestris* seedlings. *Mycorrhiza* **9**: 25–32.
- Wallenstein, M.D., McMahon, S., and Schimel, J. (2007) Bacterial and fungal community structure in Arctic tundra tussock and shrub soils: Community structure in Arctic tundra tussock and shrub soils. *FEMS Microbiol Ecol* **59**: 428–435.
- Walpolo, B.C. and Yoon, M.-H. (2013) Isolation and characterization of phosphate solubilizing bacteria and their co-inoculation efficiency on tomato plant growth and phosphorous uptake. *Afr J Microbiol Res* **7**: 266–275.
- Wang, M., Zheng, Q., Shen, Q., and Guo, S. (2013) The critical role of potassium in plant stress response. *Int J Mol Sci* **14**: 7370–7390.
- Wang, Q., Cheng, C., Agathokleous, E., Liu, Y., Li, X., and Sheng, X. (2021) Enhanced diversity and rock-weathering potential of bacterial communities inhabiting potash trachyte surface beneath mosses and lichens — A case study in Nanjing, China. *Sci Total Environ* **785**: 147357.
- Wang, Q., Cheng, C., He, L., Huang, Z., and Sheng, X. (2014) Characterization of depth-related changes in bacterial communities involved in mineral weathering along a mineral-rich soil profile. *Geomicrobiol J* **31**: 431–444.
- Wang, Q., Zhang, Z., Zhu, Y., He, L., and Sheng, X. (2018) Impact of *poxB*, *pta*, and *ackA* genes on mineral-weathering of *Enterobacter cloacae* S71. *J Basic Microbiol* **58**: 633–642.
- Wang, Y.-L., Li, L., Sun, Y., He, L., and Sheng, X. (2019) Impact of the *fliF* gene on biotite weathering of *Rhizobium pusense* S41. *Geomicrobiol J* **37**: 308–314.
- Wang, Y.L., Sun, L.-J., Xian, C.-M., Kou, F.-L., Zhu, Y., He, L.-Y., and Sheng, X.-F. (2020) Interactions between biotite and the mineral-weathering bacterium *Pseudomonas azotoformans* F77. *Appl Environ Microbiol* **86**: e02568-19.
- Watteau, F. and Bertherlin, J. (1994) Microbial dissolution of iron and aluminium from soil minerals: efficiency and specificity of hydroxamate siderophores compared to aliphatic acids. *Microb Dissolution Iron Alum Soil Miner Effic Specif Hydroxamate Siderophores Comp Aliphatic Acids* **30**: 1–9.
- Weber, K.A., Achenbach, L.A., and Coates, J.D. (2006) Microorganisms pumping iron: anaerobic microbial iron oxidation and reduction. *Nat Rev Microbiol* **4**: 752–764.
- Wehrmann, M., Berthelot, C., Billard, P., and Klebensberger, J. (2019) Rare earth element (REE)-dependent growth of *Pseudomonas putida* KT2440 relies on the ABC-transporter Peda1A2BC and is influenced by iron availability. *Front Microbiol* **10**: 2494.
- van der Weijden, C.H. and van der Weijden, R.D. (1995) Mobility of major, minor and some redox-sensitive trace elements and rare-earth elements during weathering of four granitoids in central Portugal. *Chem Geol* **125**: 149–167.
- Welch, S.A. and Ullman, W.J. (1993) The effect of organic acids on plagioclase dissolution rates and stoichiometry. *Geochim Cosmochim Acta* **57**: 2725–2736.
- Welz, D. and Braun, V. (1998) Ferric citrate transport of *Escherichia coli*: functional regions of the FecR transmembrane regulatory protein. *J Bacteriol* **180**: 2387–2394.

- White, A.F. and Buss, H.L. (2014) Natural weathering rates of silicate minerals. In *Treatise on Geochemistry*. Elsevier, pp. 115–155.
- Widdig, M., Schleuss, P.-M., Weig, A.R., Guhr, A., Biederman, L.A., Borer, E.T., et al. (2019) Nitrogen and Phosphorus Additions Alter the Abundance of Phosphorus-Solubilizing Bacteria and Phosphatase Activity in Grassland Soils. *Front Environ Sci* **7**: 185.
- Wilson, M.J., Jones, D., and McHardy, W.J. (1981) The weathering of serpentinite by *Lecanora Atra*. *The Lichenologist* **13**: 167–176.
- Wilson, M.S., Herrick, J.B., Jeon, C.O., Hinman, D.E., and Madsen, E.L. (2003) Horizontal transfer of *phnAc* dioxygenase genes within one of two phenotypically and genotypically distinctive naphthalene-degrading guilds from adjacent soil environments. *Appl Environ Microbiol* **69**: 2172–2181.
- Wingender, J., Neu, T.R., and Flemming, H.-C. (1999) What are bacterial Extracellular Polymeric Substances? In *Microbial Extracellular Polymeric Substances*. Wingender, J., Neu, T.R., and Flemming, H.-C. (eds). Berlin, Heidelberg: Springer, pp. 1–19.
- Wu, L., Jacobson, A.D., and Hausner, M. (2008) Characterization of elemental release during microbe–granite interactions at T=28°C. *Geochim Cosmochim Acta* **72**: 1076–1095.
- Wu, Y., Zhang, J., Wang, L., and Wang, Y. (2017) A rock-weathering bacterium isolated from rock surface and its role in ecological restoration on exposed carbonate rocks. *Ecol Eng* **101**: 162–169.
- Xiao, B., Lian, B., and Shao, W. (2012) Do bacterial secreted proteins play a role in the weathering of potassium-bearing rock powder? *Geomicrobiol J* **29**: 497–505.
- Xiao, L., Hao, J., Wang, W., Lian, B., Shang, G., Yang, Y., et al. (2014) The up-regulation of carbonic anhydrase genes of *Bacillus mucilaginosus* under soluble Ca²⁺ deficiency and the heterologously expressed enzyme promotes calcite dissolution. *Geomicrobiol J* **31**: 632–641.
- Xiao, L., Lian, B., Hao, J., Liu, C., and Wang, S. (2015) Effect of carbonic anhydrase on silicate weathering and carbonate formation at present day CO₂ concentrations compared to primordial values. *Sci Rep* **5**: 1–10.
- Yadav, K., Kumar, C., Archana, G., and Kumar, G.N. (2014) Artificial citrate operon and *Vitreoscilla* hemoglobin gene enhanced mineral phosphate solubilizing ability of *Enterobacter hormaechei* DHRSS. *Appl Microbiol Biotechnol* **98**: 8327–8336.
- Yu, X., Liu, X., Zhu, T.H., Liu, G.H., and Mao, C. (2011) Isolation and characterization of phosphate-solubilizing bacteria from walnut and their effect on growth and phosphorus mobilization. *Biol Fertil Soils* **47**: 437–446.
- Zacharoff, L.A., Morrone, D.J., and Bond, D.R. (2017) *Geobacter sulfurreducens* extracellular multiheme cytochrome PgcA facilitates respiration to Fe (III) oxides but not electrodes. *Front Microbiol* **8**: 2481.
- Zeng, Q., Wu, X., Wang, J., and Ding, X. (2017) Phosphate solubilization and gene expression of phosphate-solubilizing bacterium *Burkholderia multivorans* WS-FJ9 under different levels of soluble phosphate. *J Microbiol Biotechnol* **27**: 844–855.
- Zeng, Q., Wu, X., and Wen, X. (2016) Effects of soluble phosphate on phosphate-solubilizing characteristics and expression of *gcd* gene in *Pseudomonas frederiksbergensis* JW-SD2. *Curr Microbiol* **72**: 198–206.
- Zhang, C. and Kong, F. (2014) Isolation and identification of potassium-solubilizing bacteria from tobacco rhizospheric soil and their effect on tobacco plants. *Appl Soil Ecol* **82**: 18–25.
- Zhang, H. and Bloom, P.R. (1999) Dissolution kinetics of hornblende in organic acid solutions. *Soil Sci Soc Am J* **63**: 815–822.

- Zhang, Z., Huang, J., He, L., and Sheng, X. (2016) Distinct weathering ability and populations of culturable mineral-weathering bacteria in the rhizosphere and bulk soils of *Morus Alba*. *Geomicrobiol J* **33**: 39–45.
- Zhao, F., Qiu, G., Huang, Z., He, L., and Sheng, X. (2013) Characterization of *Rhizobium* sp. Q32 isolated from weathered rocks and its role in silicate mineral weathering. *Geomicrobiol J* **30**: 616–622.
- Zineb, A.B., Trabelsi, D., Ayachi, I., Barhoumi, F., Aroca, R., and Mhamdi, R. (2020) Inoculation with elite strains of phosphate-solubilizing bacteria enhances the effectiveness of fertilization with rock phosphates. *Geomicrobiol J* **37**: 22–30.

ANNEXES

Annexe 1 : Article 5 : Dual transcriptomics and proteomics analyses of the early stage of interaction between *Caballeronia mineralivorans* PML1(12) and mineral

S. Uroz, **L. Picard**, M. P. Turpault, L. Auer, J. Armengaud, P. M. Oger

Environmental Microbiology (2020)

<https://doi.org/10.1111/1462-2920.15159>

TITLE: Dual transcriptomics and proteomics analyses of the early stage of interaction between *Caballeronia mineralivorans* PML1(12) and mineral

AUTHORS: Uroz, S. ^{1,2*}, Picard, L. ^{1,2}, Turpault, M-P. ², Auer L. ¹, Armengaud, J. ³, Oger, P. ⁴

¹ Université de Lorraine, INRAE, UMR1136 « Interactions Arbres-Microorganismes », F-54280 Champenoux, France

² INRAE, UR1138 « Biogéochimie des écosystèmes forestiers », F-54280 Champenoux, France

³ Université Paris Saclay, CEA, INRAE, Département Médicaments et Technologies pour la Santé (DMTS), SPI, 30200 Bagnols-sur-Cèze, FRANCE

⁴ Université Lyon, INSA de Lyon, CNRS UMR 5240, F-69622 Villeurbanne, France

*** Corresponding author:** Mailing address:

Université de Lorraine, INRAE, “Interactions Arbres Microorganismes”, UMR 1136, 54280 Champenoux, France. Phone: +33 (0)3 83 39 40 81, Fax: +33 (0)3 83 39 40 69. E-mail: stephane.uroz@inrae.fr.

Key words: mineral weathering, *Caballeronia mineralivorans*, transcriptomics, proteomics, geochemistry

ABSTRACT

Minerals and rocks represent essential reservoirs of nutritive elements for the long-lasting functioning of forest ecosystems developed on nutrient-poor soils. While the presence of effective mineral weathering bacteria was evidenced in the rhizosphere of different plants, the molecular mechanisms involved remain uncharacterized. To fill this gap, we combined transcriptomic, proteomics, geo-chemical and physiological analyses to decipher the potential molecular mechanisms explaining the mineral weathering effectiveness of strain PML1(12) of *Caballeronia mineralivorans*. Considering the early-stage of the interaction between mineral and bacteria, we identified the genes and proteins differentially expressed when: i) the environment is depleted of certain essential nutrients (*i.e.*, Mg and Fe), ii) a mineral is added and iii) the carbon source (*i.e.*, glucose or mannitol) differs. The integration of these data demonstrates that strain PML1(12) is capable of i) mobilizing iron through the production of a NRPS-independent siderophore, ii) inducing chemotaxis and motility in response to nutrient availability and iii) strongly acidifying its environment in presence of glucose using a suite of GMC oxidoreductases to weather mineral. These results provide new insights into the molecular mechanisms involved in mineral weathering and their regulation, and highlight the complex sequence of events triggered by bacteria to weather minerals.

Originality-Significance Statement

The access and the recycling of nutrients are key processes in nutrient poor environments. In such environments, plants have developed particular strategies to adapt, notably based on the selection in their rhizosphere of functional communities effective at collecting the nutrients available in the soil or at weathering minerals. Bacteria are considered as very effective at weathering, but our understanding of the molecular mechanisms, the genes and potential regulations involved during the mineral-bacteria interaction and the mineral weathering (MW) process remains limited. To our knowledge, comprehensive investigation of such questioning was only done on a single model bacterial strain CH34 of *Cupriavidus metallidurans*. In this context, we investigated the molecular mechanism regulated in the strain PML1(12) of *Caballeronia mineralivorans* (an effective MW bacterial strain) depending on the level of nutrient availability, on the presence of a mineral and on the carbon source. The novel results obtained through the combination of geo-chemical analyses associated to genomic, transcriptomics and proteomics provided a detailed and comprehensive analysis of the functions activated or repressed depending on the presence/absence of the mineral. Our findings provide relevant information for different field of research such as environmental genomics,

geochemistry, mineralogy and soil sciences.

INTRODUCTION

Minerals and rocks represent an essential source of inorganic nutrients for the long lasting functioning of nutrient-poor or/and low-input ecosystems (April and Newton, 1992). Indeed, beside the nutrients originating from organic matter decomposition and atmospheric deposits, they are the main reservoir of nutritive elements such as magnesium, potassium, calcium and iron. However, the nutritive content of these minerals remains entrapped into their crystal structure and is not directly accessible to the biosphere. Beside their nutritive role, minerals and rocks also serve as physical support for the attachment and the development of complex microbial communities (Hutchens *et al.*, 2009; Or *et al.*, 2007). They can consequently be considered as reactive interfaces where inorganic nutrients are released and a microbial habitat (*i.e.*, the mineralosphere)(Uroz *et al.*, 2015). The dissolution of these minerals (*i.e.*, mineral weathering) is known to depend on the physico-chemical properties of these minerals (Brantley *et al.*, 2008), the action of abiotic processes (protons, water circulation), and to be amplified through the action of plants, fungi or bacteria (Drever, 1994; Landeweert *et al.*, 2001). However, our understanding of the relationship between minerals, microorganisms and nutrient availability and the impact of these factors on mineral weathering remains limited. From the few studies that have analyzed the mineral-colonizing bacterial communities into the soil, it seems that this colonization depends on the weatherability of the minerals, their nutritive content but also the local nutrient availability (Colin *et al.*, 2017; Hutchens *et al.*, 2009; Vieira *et al.*, 2020).

Resource availability is known to affect the structure and functioning of the bacterial communities. While for certain categories of substrates (*e.g.*, carbon and nitrogen related), the presence of the substrate allows for the enrichment of substrate-degraders, for other substrates (*e.g.*, iron) the low concentrations, or depletion, of the substrates allow for the selection of oligotrophic microorganisms capable of recovering this substrate from its insoluble forms or of using alternative substrates. It seems to be the case for mineral weathering bacteria (Huang *et al.*, 2014; Wang *et al.*, 2014; Uroz *et al.*, 2009). Indeed, it has now been shown through direct observation or after fertilizations that this functional ability is enriched in nutrient depleted conditions. Such relation was reported for grassland or forest ecosystems, where an enrichment of effective mineral weathering bacteria was observed in soils presenting the lower availability of P and/or the lower nutrient availability compared to nutrient-rich soils (Mander *et al.*, 2016; Nicolitch *et al.*, 2016). Similarly, several studies analyzing different horizons of a soil profile revealed an enrichment of mineral weathering bacteria in the deeper and nutrient-poorer horizons (Huang *et al.*, 2014; Wang *et al.*, 2014). Fertilization with calcium, potassium and/or

magnesium was also shown to affect the structure of the mineral weathering bacterial communities (Uroz *et al.*, 2011; Lepleux *et al.*, 2012; Nicolitch *et al.*, 2019). In this case, the amended conditions presented a lower frequency of effective mineral weathering bacteria compared to the non-amended treatment. These findings were confirmed through short-term microcosm experiments, where a single input of Mg or K in a nutrient-poor soil was shown to quickly (*i.e.*, 15 days) modify the frequency and effectiveness of mineral weathering bacteria (Nicolitch *et al.*, 2019). Together, these studies suggest that the mineral weathering bacterial communities are reactive to variations of nutrient availability, making them especially competitive in nutrient-poor conditions.

At the cellular level, nutrient limitation is known to induce important physiological regulations in bacteria, increasing notably the production of secondary metabolites, the expression of uptake systems and in certain cases motility and chemotaxis (Andrew *et al.*, 2003; Buch *et al.*, 2008; Childers *et al.*, 2002 ; Ishige *et al.*, 2003 ; Zheng *et al.*, 2017). Those modifications evidence the capability of bacteria to perceive environmental changes and to adapt to them. One of the best documented examples is when iron is depleted in their environment (Cai *et al.*, 2018; Lim *et al.*, 2012; Sasnow *et al.*, 2016). In such conditions, bacteria activate the production of iron chelating molecules (*i.e.*, siderophores, haem) and enzymes (*i.e.*, deferrochelatase, haem oxygenase) involved in the access to iron as well as the expression of dedicated transport systems (*i.e.*, TonB dependent or ABC transporters/permeases)(Andrew *et al.*, 2003; Lim *et al.*, 2012). Due to their high affinity with ferric iron and the presence of this microelement in several types of minerals, siderophores have been proposed as one of the main molecular mechanisms used by bacteria to weather minerals (Ahmed *et al.*, 2014 ; Liermann *et al.*, 2000). Indeed, these molecules may directly recover the iron entrapped into the minerals or indirectly by changing the equilibrium of the solution chemistry through the chelation of the available iron. Phosphorous represents another important nutrient, which is frequently found as limiting in soils. In P depleted conditions bacteria have been shown to regulate a wide array of genes (Ishige *et al.*, 2003; Zeng *et al.*, 2016, 2017). Glucose metabolism, ABC transporters and Pho system are generally down-regulated under P depleted conditions (Zheng *et al.*, 2016; 2017). Notably, the expression of a pyrroloquinoline quinone (PQQ)-glucose dehydrogenase gene, an enzyme involved in the solubilization of inorganic phosphorous (Goldstein, 1995), was shown to decrease in *Pseudomonas* when the concentration of soluble phosphate increased in solution (Zheng *et al.*, 2016). The important changes occurring in depleted conditions and the modulation of the production of chelating and/or acidifying molecules suggest that bacteria may

have developed molecular mechanisms suitable to interact and to recover the nutrients entrapped into the minerals, but experimental demonstrations are missing.

Comparatively to the studies deciphering the physiological responses to depleted vs repleted conditions, the physiological responses of aerobic bacteria to the presence of a mineral remains under-investigated. To our knowledge, the sole work addressing this questioning and providing a comprehensive view was done on the strain CH34 of *Cupriavidus metallidurans*, a strain isolated from Icelandic basalt (Olsson-Francis *et al.*, 2010; Bryce *et al.*, 2016). Using whole-genome microarray and proteomics, the authors revealed that this bacterial strain up-regulated the expression of genes, or produced higher levels of proteins, involved in phosphate uptake, nutrient transport, metal and redox homeostasis and motility in presence of basalt, while TonB-dependent transporters and siderophore production appeared down-regulated (Olsson-Francis *et al.*, 2010; Bryce *et al.*, 2016). In addition, Xia *et al.* (2012) evidenced the up-regulated production of some proteins (assigned as glycine hydroxyl-methyltransferase, phosphoserine aminotransferase, and ketol-acid reducto-isomerase) in a strain of *Bacillus mucilaginosus* in presence of a K- bearing mineral (*i.e.*, feldspar). Those first results suggest that complex mechanisms are activated or repressed during the mineral-bacteria interaction, but our knowledge remains limited to few bacterial strains and experimental conditions.

In this context, we investigated the molecular mechanisms used by strain PML1(12) of *Caballeronia mineralivorans* to interact and to weather minerals. This strain was isolated from a nutrient-poor forest soil and was previously characterized for its high mineral weathering effectiveness (Uroz *et al.*, 2007) and its ability to promote tree growth (Calvaruso *et al.*, 2006, 2013 ; Koele *et al.*, 2009). In this study, we developed a microcosm approach to investigate i) the genes and proteins regulated in condition of deficiency of certain nutritive elements, ii) the genes and proteins regulated in presence of a mineral in such depleted conditions and iii) how the carbon source (*i.e.*, glucose or mannitol) impacts the response of strain PML1(12). To answer these questions, we used a dual transcriptomics and proteomics approach combined with solution and mineral chemistry to document the physiological processes activated or repressed at the early stage of the interaction between mineral and bacteria.

MATERIALS AND METHODS

Bacterial strain and culture media

Strain PML1(12) was used in our study as model organism due to its mineral weathering effectiveness (Calvaruso *et al.*, 2006; Uroz *et al.*, 2007). Initially described as a *Burkholderia*, genomic and physiological analyses allowed us to assign this strain as a new species of the

genus *Caballeronia* named *Caballeronia mineralivorans* (Uroz and Oger, 2015; 2017). In addition, metagenomic analyses highlighted that culturable representatives of this genus are particularly enriched in the rhizosphere of trees as well as on the surfaces of minerals (Lepleux *et al.*, 2012; Colin *et al.*, 2017). Strain PML1(12) was grown at 25°C in solid and liquid Luria-Bertani (LB) media as well as in 1/10 diluted Tryptic Soy Agar (TSA) medium (Tryptic Soy Broth from Difco, final concentration : 3 g L⁻¹ and agar, 15 g L⁻¹). For the microcosm experiment described below, a modified version of the Bushnell-Haas (BHm; devoid of iron and magnesium) medium was used to create a nutrient deficiency complementary to the nutrients contained in the mineral used (*i.e.*, the biotite; description below). The BHm composition was as follows (g L⁻¹): KCl, 0.020; NaH₂PO₄·2H₂O, 0.080; Na₂HPO₄·2H₂O, 0.090; (NH₄)₂·SO₄, 0.065; KNO₃, 0.100; and CaCl₂, 0.020, buffered at pH 6.5 and supplemented with glucose or mannitol (2 g L⁻¹) as carbon source. Glucose or mannitol were selected because they represent the dominant carbohydrate sources found in forest soil (Jolivet *et al.*, 2006; Medeiros *et al.*, 2006) and also because strain PML1(12) presented differential mineral weathering effectiveness in relation to these two substrates (Uroz *et al.*, 2007). Indeed, the strain PML1(12) is not effective at weathering mineral with mannitol, but presents a better growth.

Mineral description and preparation

The mineral chosen was a biotite from Bancroft (Canada). Biotite is a 2:1 phyllosilicate, frequently present in acid soils, which weathers relatively quickly and holds K, Mg, and Fe nutrient elements (which are indispensable for plants). Its chemical composition is 41.01% SiO₂, 10.9% Al₂O₃, 2.21% Fe₂O₃, 10.05% FeO, 0.27% MnO, 18.9% MgO, 0.41% Na₂O, 9.46% K₂O, 2.28% TiO₂, 4.42% F, and 0.08% Zn (Calvaruso *et al.*, 2006). Its structural formula is (Si₃Al₁) (Fe³⁺_{0.12} Fe²⁺_{0.61} Mg_{2.06} Mn_{0.02} Ti_{0.13}) and K_{0.88} Na_{0.06} O₁₀ (OH_{0.98}F_{1.02}). This composition was determined with inductively coupled plasma–atomic emission spectroscopy (ICP-AES), after alkaline fusion with LiBO₂ and dissolution in HNO₃. The biotite crystals were ground, treated ultrasonically (2 min, three times at 100V) to remove the fine particles that electrostatically adhere to the particles, washed three times with distilled water, and then sieved (mesh size 200–400 µm) to obtain size calibrated particles. The particles were then dried before any manipulation. Minerals are known to release weak amounts of nutrients when introduced in aqueous solution and their dissolution is increased at acidic or basic pH (Brantley, 2008). In our experimental conditions, the spontaneous hydrolysis of biotite was due to the physical preparation of the size-calibrated particles.

Bacterial inoculum preparation

The bacterial strain PML1(12) was grown from a -80°C glycerol stock on 1/10 diluted TSA agar medium at 25 °C for 48h. A single colony was used to inoculate 50 mL of LB medium and incubated for 48h in at 25 °C. Ten milliliters of this culture were then collected, washed three times (8,000 g 15 min at 4°C) in sterile water and suspended in 5 mL sterile water to obtain a calibrated suspension at OD_{595nm} (optical density) = 1 (ca. 10⁹ cell mL⁻¹).

Experimental design

The microcosms consisted of 100-mL capped Erlenmeyer flasks filled with 45 mL of sterile BHm medium devoid of Fe and Mg, amended or not with 2 g of autoclaved biotite particles (size: 200–400 µm). To avoid iron contamination, all glassware was washed with 3% HCl and rinsed with deionised water. For each inoculated treatment, 5 mL of bacterial inoculum was added, giving a total volume of 50 mL. As a spontaneous hydrolysis of biotite is known to occur in aqueous solution, non-inoculated microcosms containing culture medium with (control with mineral, CB) and without mineral (control without mineral, C) particles were also included. In these treatments, a volume of 5 mL of sterile water was added. For each condition treatment, four flasks were prepared. Our experimental design was determined to allow a comparison between: i) the GB (glucose+bacteria) treatment vs GBwB (glucose+bacteria+biotite) treatment, where GBwB is the reference (presence of the mineral and of all the nutrients required for growth); ii) the GBwB (glucose+bacteria+biotite) treatment vs the MBwB (mannitol+bacteria+biotite) treatment, where MBwB is the reference (absence of mineral weathering). No treatment MB (mannitol+bacteria) was considered as strain PML1(12) is not effective at weathering with mannitol (Uroz *et al.*, 2007). No ‘non nutrient-limited condition’ was included in our experimental design as we were interested in the direct and indirect effect (i.e., the mineralosphere effect; Uroz *et al.*, 2015) of the introduction of the mineral in our system. Microcosms were incubated at 22 °C with agitation at 140 rpm in an orbital shaker (INFORS/Minitron). Based on preliminary data, duration of the experiment (i.e., 20h) was determined based on preliminary data to be in the early stage of interaction bacteria/mineral/solution at both biological (almost no growth) and mineralogical levels (almost no alteration). At the geochemical/mineralogical level, 20h is also the shorter incubation time with which we can measure accurately the amount of Fe released using a specific dye (Ferospectral; Uroz *et al.*, 2007) and by inductively coupled plasma-atomic emission spectrometry.

Chemical analyses

The supernatant was recovered by centrifugation (10,000 g during 15 min) and filtered at 0.22µm (GHP Acrodisc 25 mm syringe filter ; PALL). A volume of 10 mL was used to determine the concentrations of K, Na, P, Ca, Mg, Fe and Al in the different treatments. The analyses were done by inductively coupled plasma-atomic emission spectrometry (700 Series ICP-OES, Agilent Technologies). The pH was measured with a pH meter (DL70 ES, Mettler). Chemical analyses were performed for all replicates. The culture supernatant was also analyzed to determine the major organic acids released by the bacteria. These analyses were performed on an ion chromatography with conductivity detection (ICS 3000, Dionex Corp.) associated to an analytical column (IonPac® AS 11 HC, Dionex corp.) according to Balland *et al.* (2010). The supernatants were eluted with KOH solutions of varying concentrations (0.9–60 mM) over time (step gradient) with a flow rate of 1.3 mL/min. Synthetic organic acids were used as references (sodium formate, D-gluconic acid, sodium butyrate, pyruvic acid sodium salt, sodium citrate tribasic, sodium oxalate, sodium propionate, sodium acetate, succinic acid disodium salt, DL-malic acid disodium salt, sodium-L-lactate and malonic acid disodium salt).

Physiological assays

The growth of strain PML1(12) was monitored in order to determine potential biases of biomass development in presence of glucose or mannitol (2g/L) are sole carbon source. To do so, 10 µl of bacterial inoculum was inoculated in 190 µl of medium (corresponding to 1.10^6 cell/mL) with or without iron and magnesium incubated at 25°C. Iron was added as FeSO₄ (2.5 mg/L final concentration) and magnesium as MgSO₄ (20 mg/L final concentration). The optical density (OD 600nm) was measured during 4 days every 3h using a TECAN microplate reader to follow the growth and determine its maximum (OD max). Similarly, we assayed the ability of PML1(12) to grow on gluconic acid, 2 ketogluconic acid and 5 ketogluconic acid (2 g/L). To determine the potential production of iron chelating agents by the strain PML1(12), a volume of 100µl of inoculum was introduced in 10 mL of medium with glucose or mannitol as sole carbon source with or without iron and magnesium. Incubation was done at 25°C during 3 days. After this incubation period, the supernatant was recovered by centrifugation (8000g, 15 min) and filtrated at 0.22µm. The presence of iron chelating agents was quantified using the liquid Chromazurol assay (CAS) of Schwyn and Neilands (1987). To do it, a volume of 100µl of the supernatant inoculated or not was then mixed with the CAS solution and incubated 1h at ambient temperature before reading the absorbance at 655 nm with a microplate reader.

Experiments with control solutions at different pH (i.e., culture medium with adjusted from 6.5

to 2.5) confirmed that the results obtained in the CAS assay were not due to a strict acidification, but to the production of a chelating agent by the strain PML1(12).

RNA extraction and sequencing

After 20h of incubation, 10 mL of culture was recovered and centrifuged at 8000 g (15 min; 4°C) to pellet the bacterial cells. Supernatants were removed and cells were frozen in liquid nitrogen and stored at -80°C. Total RNA was purified using the RiboPure™ kit (Ambion, Austin, USA) following the manufacturer's recommendations, then treated twice with DNase I (Ambion), precipitated with ethanol and resuspended in RNase-free water. The concentration and quality of the extracted RNA was determined by measuring its absorbance using a Nanodrop 2000 spectrophotometer (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA), a Qubit® RNA Assay Kit in a Qubit® 2.0 Fluorometer (Life Technologies, CA, United States) and TapeStation analyses. The RNA integrity number value was 9.0 on average. The total RNA were sent to GENEWIZ which operated the rRNA depletion using the Ribo-Zero rRNA removal kit for bacteria, performed the stranded RNA library preparation and sequenced the cDNA on their Illumina HiSeq2500 platform using a 2x100bp paired-end (PE) configuration in High Output mode (V4chemistry). This sequencing generated a total of at least 250 million reads per lane.

Protein extraction and tandem mass spectrometry

After 20h of incubation, 5 mL of culture were recovered and centrifuged to pellet the bacteria. Supernatants were removed and cells were frozen in liquid nitrogen and stored at -80 °C. For each sample, the cell pellet was homogenized in a volume (25 µL per mg of cellular pellet (wet weight) of lithium dodecyl sulfate 1X lysis buffer (Invitrogen), supplemented with 200 mg of 0.1 mm silica beads (MP Biomedicals), and disrupted by bead-beating with a Precellys Evolution instrument (Bertin Technologies) operated at 7,800 rpm for 3 cycles of 20 seconds, with 30 seconds of pause between each cycle. The samples were then centrifuged at 16,000 g for 1 min. The resulting supernatants were heated at 99°C for 5 min. A volume of 25 µL of each sample was loaded on a NuPAGE 4-12% Bis-Tris gel and subjected to electrophoresis for 5 min at 200 V. After migration, the proteins were stained with Coomassie SimplyBlue SafeStain (Invitrogen). In-gel proteolysis of the whole proteome sliced in a single polyacrylamide band was performed with 0.2 µg of trypsin gold (Promega) supplemented with 50 µl of 0.01% ProteaseMAX surfactant (Promega) as previously described (Hartmann *et al.*, 2014). After incubation at 37°C for 4h, the solution was acidified with 5% trifluoroacetic acid and the final volume adjusted to 50µl of 0.1% trifluoroacetic acid if required. A volume of 5 µl of this

suspension was then injected to identify the resulting peptides by tandem mass spectrometry using a Q-Exactive HF instrument (Thermo Scientific) coupled to an ultimate 300 nanoLC system (Thermo Scientific) in the same conditions as those described by Hayoun (Hayoun *et al.*, 2019). Peptides were resolved on an Acclaim PepMap100 C18 reversed-phase column (3 μm , 100 \AA , 75 μm id x 50 cm) over a 90 min gradient.

Bioinformatic and statistical analyses

The RNAseq reads were mapped to the coding sequences (CDS) of the genome of strain PML1(12) through the Microscope (Vallenet *et al.*, 2019) annotation platform using the BWA (version 0.7.4-r385; Li and Durbin, 2009). Genes differentially expressed were sorted according to the genome sequence of strain PML1(12)(AEJF00000000) and raw data statistics are accessible on MICROSCOPE (<https://mage.genoscope.cns.fr/microscope/home/index.php?act=logout>; login : guest2020 password : Ic7Hf3). Raw data are under deposit on EMB-EBI (<https://www.ebi.ac.uk/arrayexpress/> ; E_N00000). For proteins, MS/MS spectra were queried against a database with the theoretical coding sequences of *Caballeronia mineralivorans* PML1(12) using the Mascot Daemon software version 2.6.1 (Matrix Science). The parameters used for this search were: peptide charge of 2+ or 3+, 5 ppm peptide tolerance, 0.02 Da MS/MS fragment tolerance, carbamidomethylation of cysteine as fixed modification, and oxidation of methionine as variable modification. A protein was validated on the basis of two identified peptide sequences and with a final discovery rate of less than 1% as estimated with a decoy database search. Proteins differentially produced were also sorted according to the genome sequence of strain PML1(12) and a matrix generated (Pride access N°PXD000000). The effect of the different treatments (*i.e.*, GB, GBwB and MBwB) on both RNA and protein datasets was determined using the mixOmics R package (González *et al.*, 2012; Rohart *et al.*, 2017). For each approach (*i.e.*, RNA or protein), datasets were first filtered to only retain consistent genes (*i.e.* with at least 100 in one sample for the RNAseq dataset and at least 30 in the whole proteome dataset). A Partial Least Squares (PLS) regression was first done to integrate the RNAseq and proteome matrix and generate a ordination plot. To allow better interpretability, a Sparse Partial Least Squares regression (sPLS) was then performed as it allows simultaneous variable selection in the two data sets. Number of dimensions was determined based on cumulative explained variance and number of selected variables (*i.e.*, genes) considered in the sPLS was set to 50 per component axis and method (transcriptomics or proteomics). Distribution of the selected genes was then visualized in a correlation circle plot, evidencing

Table 1: Solution chemistry

Data presented are biological replicates (n = 4). For each element the values with different superscript letters (a, b, c) are significantly different according to one-factor (treatment) ANOVA and a Bonferroni-Dunn test (P<0.05). (C, control medium ; CB control medium with biotite, MBwB, mannitol with bacteria and biotite ; GBwB, glucose with bacteria and biotite ; GB, glucose with bacteria). The symbols + or – mean presence or absence.

Treatment	Conditions			pH and inorganic nutrient							
	Substrate	Biotite	Bacteria	pH	K	Na	P	Ca	Mg	Fe	Al
				Concentration (mg/L)							
C	-	-	-	6.49	45.53	36.55	32.14	0.81	0.01	0.06	0.01
				±0.00 ^a	±1.60 ^a	±0.13 ^a	±0.12 ^a	±0.01 ^a	±0.00 ^a	±0.00 ^a	±0.00 ^a
CB	-	-	-	6.48	49.27	39.76	34.56	2.39	1.21	0.33	0.19
				±0.01 ^a	±1.11 ^b	±0.01 ^b	±0.78 ^b	±0.34 ^b	±0.12 ^b	±0.09 ^b	±0.06 ^b
MBwB	Mannitol	+	+	4.03	47.82	35.47	29.57	2.49	1.13	0.27	0.40
				±0.03 ^b	±1.03 ^b	±0.01 ^a	±0.97 ^c	±0.39 ^b	±0.12 ^b	±0.12 ^b	±0.07 ^c
GBwB	Glucose	+	+	2.77	48.99	35.70	30.71	2.81	1.47	1.54	0.75
				±0.02 ^c	±0.34 ^b	±0.00 ^a	±0.28 ^c	±0.17 ^b	±0.00 ^c	±0.01 ^c	±0.00 ^d
GB	Glucose	-	+	2.78	45.52	36.54	32.17	0.81	0.01	0.06	0.01
				±0.02 ^c	±1.27 ^a	±0.01 ^a	±1.20 ^b	±0.33 ^a	±0.01 ^a	±0.04 ^a	±0.01 ^a

treatment specific genes. Selected genes were then compared to the outputs of the DESeq2 analysis. DESeq2 (Anders and Huber, 2010; Love *et al.*, 2014) was used to calculate differential gene and protein expression between the different treatments. Read number normalization in each treatment was performed (using estimates of size factors in DESeq2 and normalization) for replicates. Differential expression values (FoldChange) and statistical values (pVal and adjusted pVal through the Benjamini and Hochberg's approaches) assessing the false discovery rate (FDR) were then calculated. Genes with an adjusted p-value inferior to 0.05 and a cut-off for absolute fold change > 1 were considered as significantly differentially expressed. For the proteomics data, a cut-off for fold change > 0.3 was considered.

Concerning the chemical analyses, the effect of the different treatments on the organic acid production, the pH and inorganic nutrients released in solution was determined by analysis of variance (one way ANOVA, $p < 0.05$, followed by a Tukey test).

RESULTS

Chemical analyses of the Solution

The analyses done after 20h incubation on the solution (*i.e.*, culture medium) revealed significant differences between the different biotic and abiotic treatments (GB, Glucose with bacteria; GBwB, glucose with bacteria and biotite; MBwB, mannitol with bacteria and biotite; C, Control without bacteria and biotite and CB, Control without bacteria with biotite) (Table 1; Figure 1). The measures done in the abiotic controls confirmed that in the absence of biotite, the culture medium was depleted in iron and magnesium ($p < 0.05$). The addition of biotite modified the solution chemistry, provoking a significant increase in the solution of the nutrients coming from biotite dissolution. The spontaneous hydrolysis of minerals when introduced in aqueous solution is a well-known phenomenon, especially for mineral particles freshly prepared (Brantley, 2008). Due to the spontaneous hydrolysis of biotite, the amount of iron, aluminium and magnesium were increased ($p < 0.05$). Although these amounts remain low, they made the medium amended with biotite capable of sustaining all the nutritional needs of strain PML1(12). In absence of biotite, the inoculation of PML1(12) (*i.e.*, GB treatment) gave the same solution chemistry than the non-inoculated treatment (*i.e.*, C treatment), except that the pH of the solution decreased from pH 6.5 to 2.78. The comparison of the treatments amended with biotite and containing glucose evidenced a significant increase of iron, magnesium and aluminium in the solution of the inoculated treatment compared to CB (Control with biotite without bacteria), while the concentrations of other nutrients (Na, P, Ca) decreased ($p < 0.05$). These measures showed that biotite was at a very early stage of dissolution, as a maximum of 0.1% of its Fe

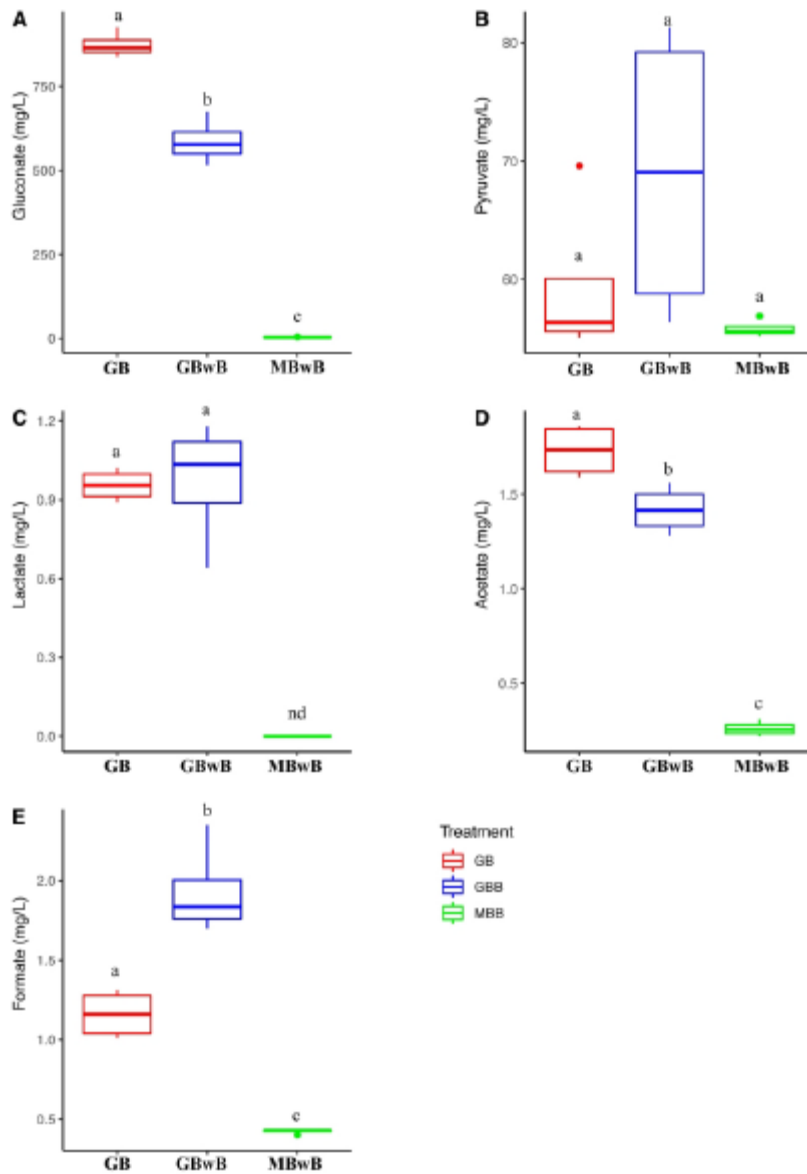


Figure 1: Organic acid quantification

Data presented are biological replicates ($n = 4$). For each element the values with different superscript letters (a, b, c) are significantly different according to one-factor (treatment) ANOVA and a Bonferroni-Dunn test ($P < 0.05$). (MBwB, mannitol with bacteria and biotite; GBwB, glucose with bacteria and biotite; GB, glucose with bacteria). Y-axis have been scaled according to the organic acid concentrations measured. No organic acids have been detected in the non-inoculated treatments (C, control medium; CB control medium with biotite).

content was found in solution in the inoculated treatment (GBwB). In presence of glucose (GB and GBwB), the pH of the solution reached a value of 2.77 in presence or absence of biotite. When the microcosms were amended with mannitol (MBwB) as carbon substrate only a significant increase of aluminium in the solution of the inoculated treatment and a decrease of Na and P were observed, without variations of magnesium and iron compared to the control. In presence of mannitol, the pH of the solution reached a value of 4.03. Last, the comparison of the treatments amended with biotite and a carbon source (i.e., glucose (GBwB) or mannitol (MBwB)) evidenced a significant increase of iron, magnesium and aluminium in the solution of the glucose amended treatment (GBwB) compared to the mannitol amended treatment (MBwB ; $p < 0.05$), and no differences for the other nutrients (Na, P, Ca). The pH of the solution appeared significantly more acidic in the treatment amended with glucose than with mannitol ($p < 0.05$).

In the inoculated treatments, the main organic acids detected were gluconate and pyruvate (Figure 1). Very low concentrations of lactate, formate, oxalate and acetate were detected. In presence of glucose, significantly more gluconate was produced in absence (GB, 874 mg L^{-1}) than in presence of biotite (GBwB, 586 mg L^{-1} ; $p < 0.05$). Gluconate concentration was comparatively very low in presence of mannitol (3.65 mg L^{-1}). No organic acid was detected in the abiotic treatments.

Physiological properties

When the growth assays were done in the presence of iron and magnesium, no difference was observed in the first 20h of incubation between the glucose or mannitol conditions (Figure S1). However, we observed that after this incubation period, a higher biomass was obtained with mannitol ($\text{OD}_{\text{max}}=0.8$ after 46h ; ca. $8 \cdot 10^8 \text{ cell mL}^{-1}$) compared to glucose ($\text{OD}_{\text{max}}=0.65$ after 40h; ca. $5 \cdot 10^7 \text{ cell mL}^{-1}$). In the absence of iron, we observed a delay in growth in comparison to the nutrient rich (i.e., with iron and magnesium) conditions, but no significant difference in the first 20h of growth between the glucose and mannitol conditions. In such environments, a higher biomass was obtained with mannitol ($\text{OD}_{\text{max}}=0.53$ after 65h; ca. $3 \cdot 10^7 \text{ cell mL}^{-1}$) compared to glucose ($\text{OD}_{\text{max}}=0.47$ after 55h; ca. $8 \cdot 10^6 \text{ cell mL}^{-1}$)(Figure S1). In absence of iron in the culture medium, the chromazuril assay highlighted that strain PML1(12) produced a chelating agent in both glucose and mannitol treatments (Figure S2). In presence of iron, no chelating agent was detected using the CAS assay. No chelating agent was detected in the culture supernatant in presence of biotite.

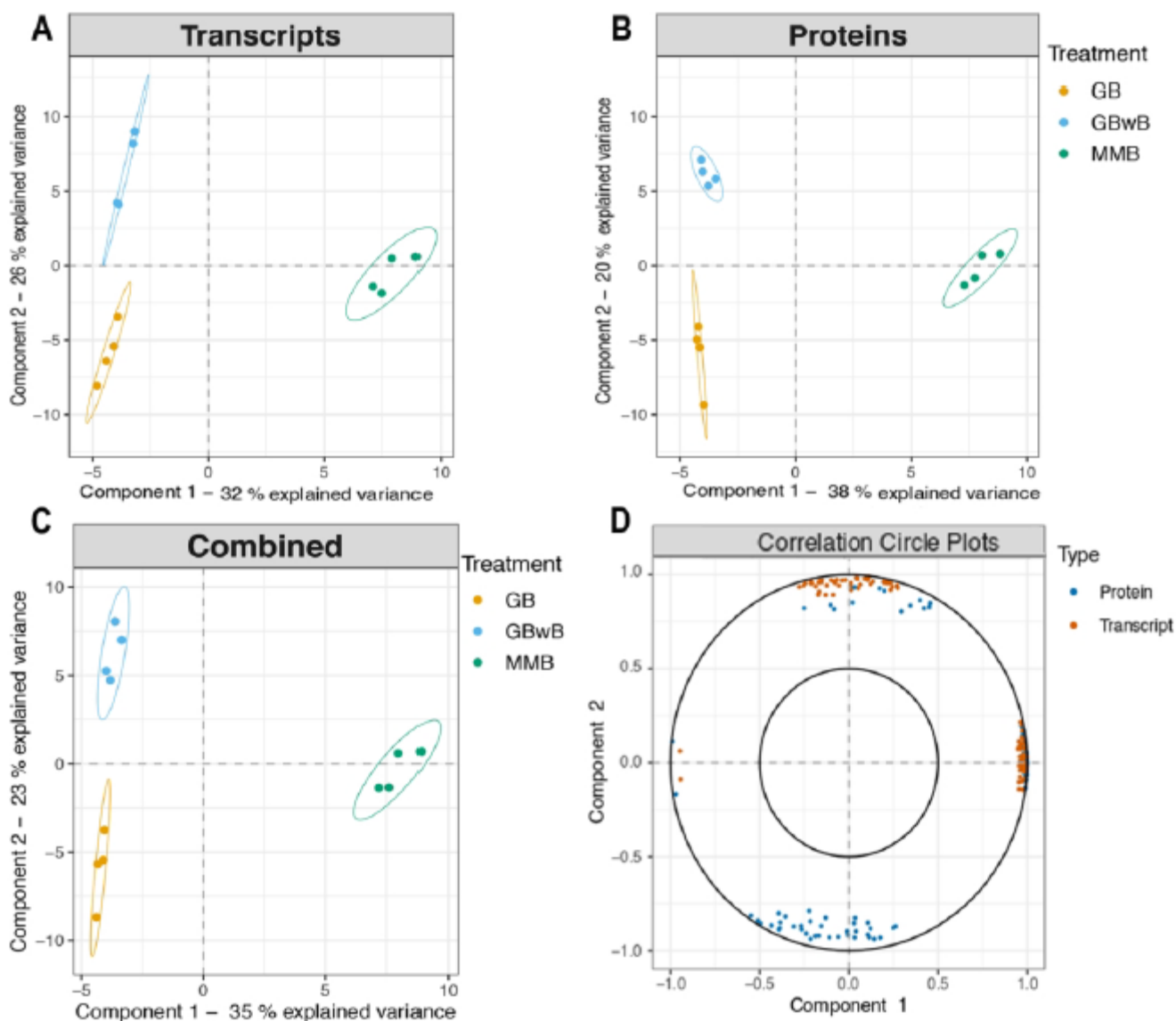


Figure 2: Multivariate analyses on transcriptome and proteome data

Visualization of sparse Partial Least Squares regression (sPLS) sample projection plots according to A) RNAseq data, B) Proteomics data and combined (RNAseq+Proteomics) data (C). In each panel (A,B and C), the colour code is : GB, orange; GBwB, blue and MBwB, green. The panel D presents a correlation circle plot highlighting the 100 genes the most associated to the treatments considered (i.e., GB (glucose with bacteria), MBwB (mannitol with bacteria and biotite) and GBwB (glucose with bacteria and biotite), according to protein (blue) and transcript (orange). The list of the genes is presented in Table S1. Confidence ellipses for each treatment are plotted to highlight the strength of the discrimination (confidence level set to 95%)

Transcriptome and proteome statistics and comparisons

After 20h incubation time, the same samples were used to extract RNA and recover proteins. This specific time point (i.e., 20h) was considered based on preliminary experiments to be at the shorter incubation time with which we can measure accurately the amount of Fe and Mg released from biotite (i.e., biotite dissolution). Before 20h the quantities of Fe and Mg released in solution are difficult to distinguish accurately from that of the control without bacteria. In addition, by considering 20h we limited the cell growth, but we allowed enough cell replication to be able to perceive physiological variations at the RNA and protein levels. For the RNAseq dataset, the number of reads retained after barcode removal and quality control, varied from 35 to 45 million, giving a total of 138 Gb of 150bp paired-end sequence data. Between 98.16 and 99.78% of reads mapped at least once on the genome of *C. mineralivorans* PML1(12). After the removal of the unmapped sequences and of the remaining rRNA sequences, between 80 to 91% of the total number of reads were retained. A total of 3,984 and 3,644 differentially expressed genes (DEG); corresponding to 43.5 and 39.8% of the genes of PML1(12), respectively) were detected in GBwB and MBwB treatments with a significant pvalue (details in material and methods). When a threshold of 1/-1 (log₂FC) was applied, DEG number reached 1,153 and 1,241 (corresponding to 12.6 and 13.5% of the genes of PML1(12), respectively) in GB/GBwB and GBwB/MBwB treatment comparisons, respectively. The proteomics dataset consisted in a total of 576,330 MS/MS spectra that were recorded at high resolution, among which 368,661 (61%) were assigned to peptide sequences attributed to strain PML1(12). The number of peptide sequences per sample varied from 25,000 to 37,000. Based on stringent parameters (at least two peptides per protein and FDR below 1%), a total of 2,408 proteins were identified.

To obtain a global view of our dataset, multivariate analyses (i.e., Partial Least Squares regression (PLS)) were performed as recommended (Gouveia et al., 2020) because it can readily handle multiple dependent categorical variables and is compatible with noisy data sets. To allow a good and interpretable visualization of the genes associated to each treatment, variable selection was performed using a Sparse Partial Least Squares approach (sPLS). These analyses clearly differentiate the treatments (i.e., GB vs GBwB vs MBwB): both the RNA-based, the protein-based and the combined (RNA+protein) analyses gave a good discrimination of the different treatments considered (Figure 2). Selected genes associated to each treatment are presented in Table S1. This multivariate analysis was further complemented by a detailed analysis using DESeq2. For each treatment comparison (i.e., GB vs GBwB or MBwB vs GBwB), the transcriptome and proteome data were compared according to the differential

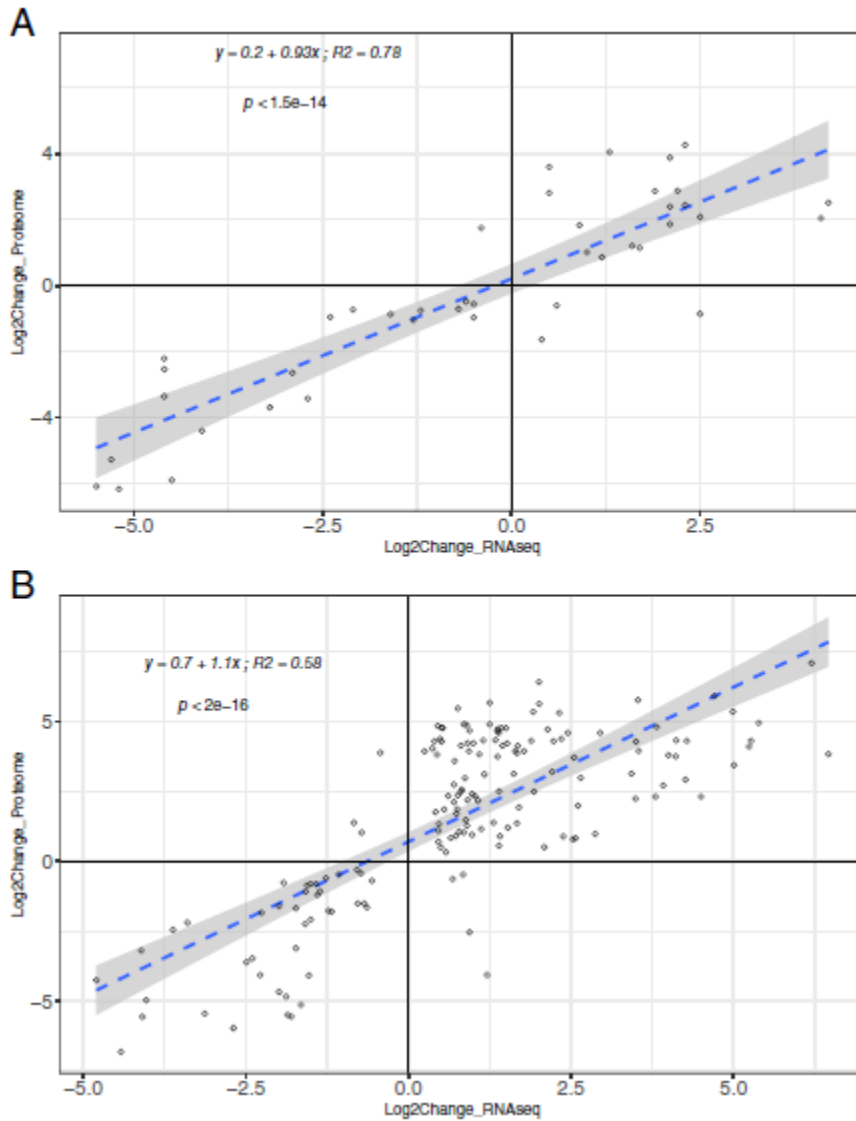


Figure 3: Relationship between the transcriptomic and proteomic data

A. Relationship between DEG and DPP in the treatments GB versus GBwB. B. Relationship between DEG and DPP in the treatments GBwB versus MBwB. Linear regression analyses have been done for each comparison and the R2 and p values are presented.

expression/abundance (i.e., RNA and proteins). These analyses revealed that though the proteomes were supported by a smaller number of proteins identified as significantly differentially produced (DPP) compared the DEG of the transcriptomes, the sequences encoding these proteins were found in the related transcriptome. In the comparison GB/GBwB, 100% of the differentially produced proteins (i.e., 41 in total) were recovered in the 1153 DEG of the related transcriptome (Figure 3A). In the comparison GBwB/MBwB, 82% of the DPP (i.e., 198 in total) were recovered in the 1241 DEG of the related transcriptome (Figure 3B). The comparison of the DEG and DPP obtained through the transcriptomic and proteomics approaches revealed significant correlations according to linear regression analyses ($p < 0.0001$; R^2 : 0.78 for GB/GBwB; R^2 : 0.58 for GBwB/MBwB), showing that the common down- and up-regulated genes followed the same trend in the transcriptome and proteome datasets. Genes that were differentially regulated ($\log_2FC \geq 1$) and common to the RNAseq and proteomics dataset are presented in Table 2.

Overview of the variations in the Clusters of Orthologous Groups (COG)

Although the depth of analysis was very different between the two methods (i.e., proteomics and transcriptomics), a functional analysis was performed to assign the differentially regulated genes of *C. mineralivorans* PML1(12) into the COG categories both at the RNA and protein levels (Figure 4). In the glucose treatments (i.e., GB vs GBwB), the higher percentages of DEG and DPP were observed for the amino acid transport and metabolism (RNA: 11.2% vs Protein: 17%), cell wall/membrane/envelope biogenesis (RNA: 8.2% vs Protein: 19.5%), carbohydrate transport (RNA: 8.2% vs Protein: 19.5%) and inorganic ion transport and metabolism (RNA: 7.45% vs Protein: 19.5%). The main differences between these two treatments in the transcriptome were observed for cell motility (6% in GBwB vs 0.13% in GB), cell wall/membrane/envelope biogenesis (6% in GBwB vs 2.2% in GB) and in carbohydrate metabolism and signal transduction (Figure 4AB). A focus on the GB treatment revealed only a higher proportion of DEG in the categories S (poorly characterized functions, GB: 3.85% vs GBwB: 1.72%), H (coenzyme transport and metabolism, GB: 1.40% vs GBwB: 0.66%) and K (Transcription, GB: 3.36% vs GBwB: 2.78%) detected by the transcriptome. At the proteome level, several COG categories were not detected in the GB treatment among the DPP (i.e., C, D, F, G, H, K, L, N, S). Cell wall/membrane/envelope biogenesis and amino acids were more represented in the GBwB treatment, while only the category P (Inorganic ion transport and metabolism) appeared higher in the GB treatment (GB: 12.20% vs GBwB: 4.88%).

Table 2: Genes shared between the RNAseq and Proteomic analysesFor legibility, only the genes presenting a log2fold change ≥ 1 in one of both analysis methods are presented.

Treatment comparison	Gene label	RNA Log2fold change	Protein Log2fold change	Gene description	
GB>GBwB	KLU25682.1	5.5	6.09	Carbohydrate porin, OprB family protein	
	KLU25663.1	5.3	5.28	Metal ion transporter, metal ion (Mn2+/Fe2+) transporter family	
	KLU24497.1	5.2	6.17	Natural resistance-associated macrophage protein	
	KLU25829.1	4.6	2.54	Fe(3+)binding periplasmic protein	
	KLU25857.1	4.6	2.22	Conserved exported protein of unknown function	
	KLU25831.1	4.6	3.36	Carbohydrate-selective porin, OprB family protein	
	KLU25830.1	4.5	5.9	Deferrochelataase/peroxidase EfeN	
	KLU23737.1	4.1	4.41	Porin	
	KLU25827.1	3.2	3.7	Fe(3+) ions import ATP-binding protein FbpC 1	
	KLU20238.1	2.9	2.65	Conserved exported protein of unknown function	
	KLU25515.1	2.7	3.43	Conserved protein of unknown function	
	KLU22360.1	2.4	0.96	Acetylornithine aminotransferase	
	KLU21598.1	2.1	0.74	Transketolase	
	KLU21713.1	1.6	0.87	Conserved membrane protein of unknown function	
	KLU22586.1	1.3	1.05	Putative periplasmic serine endoprotease DegPlike	
	KLU21996.1	1.2	0.76	Phasin family protein	
	GBwB>GB	KLU22330.1	4.2	2.51	Dihydroxyacid dehydratase 2
		KLU22887.1	4.1	2.04	Type I flagellin
		KLU27932.1	2.5	2.08	EPS I polysaccharide export outer membrane protein EpsA
		KLU27902.1	2.3	2.44	Putative tyrosine protein kinase EpsB
KLU22415.1		2.3	4.26	Conserved protein of unknown function	
KLU22416.1		2.2	2.88	Thioredoxin-independent 5'adenylylsulfate reductase	
KLU23206.1		2.1	3.87	Extracellular ligand-binding receptor	
KLU22414.1		2.1	2.39	Ferredoxin nitrite reductase	
KLU22418.1		2.1	1.86	Sulfate adenylyltransferase, subunit 1	
KLU22417.1		1.9	2.86	Sulfate adenylyltransferase, subunit 2	
KLU27452.1		1.7	1.14	Glutamate synthase, large subunit	
KLU26653.1		1.6	1.2	Alkyl hydroperoxide reductase, C22 subunit, thioredoxin-like	
KLU27581.1		1.3	4.04	Ribonucleoside diphosphate reductase, alpha subunit	
KLU22650.1		1.2	0.86	Bifunctional protein [Includes: 4-hydroxy-2-oxoglutarate aldolase (2-keto-4-hydroxyglutarate aldolase) (KHGaldolase)	
GBwB>MBwB		KLU22330.1	1	1.01	phosphogluconate dehydratase (6-phosphogluconate dehydratase)
	KLU20902.1	4.8	4.25	2-dehydro-3-deoxygluconokinase	
	KLU20903.1	4.42	6.81	Xylose isomerase domain protein TIM barrel	
	KLU20900.1	4.11	3.19	Gluconate 2-dehydrogenase (GADH)	
	KLU20901.1	4.09	5.55	Major facilitator superfamily (MFS) 2-ketogluconate transporter	
	KLU25588.1	4.03	4.96	Ribulose biphosphate carboxylase large chain	
	KLU26354.1	3.62	2.45	Ubiquinol oxidase subunit I, cyanide insensitive	
	KLU25460.1	3.4	2.19	conserved exported protein of unknown function	
	KLU26296.1	3.13	5.44	L-carnitine dehydratase/bile acid-inducible protein F	
	KLU20899.1	2.69	5.96	Transcriptional regulator LacI family	
	KLU26286.1	2.49	3.6	Glyoxalase domain-containing protein 5	
	KLU26285.1	2.4	3.47	Hydroxymethylglutaryl-CoA lyase YngG	
	KLU25583.1	2.28	4.06	transketolase 1, thiamin-binding	
	KLU25461.1	2.26	1.83	Aldehyde oxidase and xanthine dehydrogenase molybdopterin binding protein	
	KLU26139.1	1.99	4.67	Heavy metal sensor kinase	
	KLU27456.1	1.99	1.61	ABC transporter fused ATPase and inner membrane subunits	
	KLU22174.1	1.92	0.77	ABC-type sugar import system ATP-binding protein	
	KLU25978.1	1.88	4.83	GMC oxidoreductase (cytochrome c subunit) (GMC1)	
	KLU25169.1	1.86	5.49	GMC oxidoreductase flavoprotein (GMC1)	
	KLU26140.1	1.8	5.55	DNA-binding response regulator in two-component regulatory system with CusS	
KLU25857.1	1.73	3.1	Conserved exported protein of unknown function		
KLU25551.1	1.73	1.67	DNA-binding response regulator in two-component regulatory system with EnvZ		

(Continues)

Table 2: Continued

Treatment comparison	Gene label	RNA Log2fold change	Protein	Gene description
MBwB>GBwB	KLU21903.1	1.65	5.13	Threonine 3-dehydrogenase, NAD(P)-binding
	KLU22175.1	1.59	2.24	ABC-type sugar transport system, permease component
	KLU21714.1	1.58	1.08	Putative phage shock protein A, PspA
	KLU22586.1	1.56	0.85	Putative periplasmic serine endoprotease DegP-like
	KLU27807.1	1.53	4.08	Toxin RTX-I translocation ATP-binding protein
	KLU26275.1	1.5	0.81	L-allo-threonine aldolase, PLP-dependent
	KLU22996.1	1.5	2.08	LysR family transcriptional regulator
	KLU25162.1	1.42	0.81	Secretion protein HlyD
	KLU25161.1	1.4	1.2	RND efflux system, outer membrane lipoprotein, NodT family
	KLU25812.1	1.36	1.07	2-dehydropantoate 2-reductase
	KLU26830.1	1.27	0.6	Glucose-6-phosphate 1-dehydrogenase
	KLU25163.1	1.23	1.77	Acriflavin resistance protein
	KLU27426.1	1.18	1.8	Thiol:disulfide interchange protein DsbD
	KLU25815.1	1.07	0.47	Gluconate-6-phosphate dehydrogenase, decarboxylating
	KLU25165.1	0.64	1.64	Transcriptional regulator
	KLU26679.1	6.46	3.83	MotA/TolQ/ExbB proton channel
	KLU26735.1	6.2	7.09	Aliphatic amidase
	KLU22511.1	5.39	4.95	Mannitol ABC transporter permease
	KLU22512.1	5.27	4.31	Mannitol ABC transporter permease
	KLU22510.1	5.24	4.1	Sugar ABC transporter substrate-binding protein probably mannitol
	KLU22513.1	5.01	3.44	Various polyols ABC transporter, ATP-binding component mannitol
	KLU22517.1	4.99	5.35	HAD-superfamily hydrolase subfamily IA variant3
	KLU26684.1	4.71	5.91	Outer membrane receptor for Fe transport
	KLU25090.1	4.5	2.32	Outer membrane porin, OmpC family
	KLU26880.1	4.28	4.31	ROK family protein
	KLU21109.1	4.26	2.92	conserved exported protein of unknown function
	KLU26879.1	4.12	4.33	ABC-type sugar transport system, ATPase component
	KLU22509.1	4.11	3.75	Sorbitol dehydrogenase
	KLU22486.1	4	3.8	Mannitol 2-dehydrogenase
	KLU26877.1	3.92	2.72	Monosaccharide-transporting ATPase
	KLU21104.1	3.82	4.81	Uncharacterized aminotransferase y4uB
	KLU21105.1	3.8	2.31	Putrescine transporter subunit: periplasmic-binding component of ABC superfamily
	KLU24527.1	3.54	3.95	Extracellular solute-binding protein
	KLU24224.1	3.53	5.76	Putative terminal quinol oxidase, subunit DoxD
	KLU24628.1	3.5	4.28	ABC spermidine/putrescine transporter periplasmic ligand binding protein
	KLU25113.1	3.49	2.24	OmpA/MotB domain protein
	KLU22485.1	3.43	3.14	Xylulokinase
	KLU27811.1	2.95	4.6	Outer membrane efflux protein
	KLU23857.1	2.87	0.98	Outer membrane porin protein 32
	KLU21700.1	2.65	2.98	Purine-binding protein BAB2_0673
	KLU26594.1	2.61	1.99	Extracellular solute-binding protein family 3
	KLU25782.1	2.57	0.83	Outer membrane porin, OmpC family
	KLU27028.1	2.55	3.71	ABC-type Fe ³⁺ transport system, periplasmic component
	KLU25201.1	2.53	0.79	Porin, Gram-negative type
	KLU24227.1	2.45	4.59	Conserved exported protein of unknown function
	KLU22985.1	2.38	0.89	Branched chain amino acid ABC transporter periplasmic ligand-binding protein
	KLU27088.1	2.35	4.38	ABC spermidine/putrescine transporter, periplasmic ligand binding protein
	KLU24228.1	2.32	5.31	Putative sulfate-binding protein
	KLU22945.1	2.23	4.3	Ribokinase-like domain-containing protein
	KLU24580.1	2.21	3.2	Rhamnosyltransferase 1 subunit A (modular protein)
KLU26893.1	2.14	4.72	Glutamate synthase (NADPH/NADH) small chain	
KLU26944.1	2.09	0.51	lysine/arginine/ornithine transporter subunit	
KLU24582.1	2.01	6.41	Glycosyl transferase family 28	
KLU22856.1	2.01	5.63	LacI family transcription regulator	

(Continues)

Table 2: Continued

Treatment comparison	Gene label	RNA Log2fold change	Protein	Gene description
	KLU20457.1	1.93	2.49	Flp pilus assembly protein, ATPase CpaF
	KLU27862.1	1.92	5.34	Putative branched-chain amino acid transport protein (ABC superfamily, peri_bind)
	KLU26449.1	1.89	4.31	Multidrug efflux system
	KLU27863.1	1.78	3.94	Urea ABC transporter, permease protein UrtB
	KLU22721.1	1.7	1.93	Multiphosphoryl transfer protein [Includes: Phosphoenolpyruvate-protein phosphotransferase
	KLU22446.1	1.68	4.13	Periplasmic-binding protein/LacI transcriptional regulator
	KLU23320.1	1.67	3.87	Conserved exported protein of unknown function
	KLU21100.1	1.67	1.37	Gamma-Glu-gamma-aminobutyraldehyde dehydrogenase, NAD(P)H-dependent
	KLU24584.1	1.64	3.95	RND efflux system, outer membrane lipoprotein, NodT family protein
	KLU22211.1	1.62	3.13	Sugar-binding domain protein
	KLU22479.1	1.53	1.21	Leucine/isoleucine/valine transporter subunit
	KLU22903.1	1.52	4.22	Purine-binding chemotaxis protein
	KLU25776.1	1.5	4.76	Nitrite reductase, large subunit, nucleotide- and Fe/S-cluster binding
	KLU22449.1	1.45	4.14	Ribokinase-like domain-containing protein
	KLU22904.1	1.43	4.77	Methyl-accepting chemotaxis protein I
	KLU22480.1	1.41	0.9	Leucine/isoleucine/valine transporter subunit
	KLU25770.1	1.39	2.51	Glycosyl transferase family 2
	KLU22450.1	1.39	4.59	Tagatose 6-phosphate aldolase 1, kbaZ subunit
	KLU21570.1	1.39	0.56	Putrescine transporter subunit: periplasmic-binding component of ABC superfamily
	KLU25180.1	1.37	4.73	Tryptophan 2-monooxygenase
	KLU24332.1	1.37	4.66	Conserved exported protein of unknown function
	KLU24008.1	1.37	3.74	Aldehyde dehydrogenase family 16 member A1
	KLU26896.1	1.34	4.33	D-hydantoinase/dihydropyrimidinase
	KLU23259.1	1.31	1.38	Dipeptide transporter
	KLU24373.1	1.25	5.67	Methyl-accepting chemotaxis serine transducer
	KLU27577.1	1.25	4.9	Signal recognition particle receptor FtsY
	KLU22386.1	1.17	3.11	Methyl-accepting chemotaxis serine transducer
	KLU22934.1	1.15	4.32	Chemotaxis regulator, protein phosphatase for CheY
	KLU26892.1	1.12	1.16	Beta-ureidopropionase
	KLU22902.1	1.09	3.83	Chemotactic sensory histidine kinase (system CheB and CheY)/ sensory histidine kinase
	KLU25155.1	1.07	2.18	Conserved protein of unknown function (Transglutaminase domain)
	KLU23842.1	1.02	2.34	Acetaldehyde dehydrogenase 2 (Acetaldehyde dehydrogenase II) (ACDH-II)
	KLU22933.1	1	4.22	Chemotaxis regulator transmitting signal to flagellar motor component
	KLU25785.1	0.98	2.4	Conserved protein of unknown function
	KLU26541.1	0.94	4.67	Putative outer membrane porin
	KLU23324.1	0.93	3.94	Cell wall structural complex MreBCD, actin-like component MreB
	KLU25832.1	0.91	4.23	Extracellular ligand-binding receptor
	KLU22907.1	0.91	2.19	Fused chemotaxis regulator
	KLU22181.1	0.9	1.27	Outer membrane porin, OmpC family
	KLU21679.1	0.9	4.88	Extracellular solute-binding protein family 5
	KLU23119.1	0.88	1.48	SMC domain protein
	KLU26120.1	0.87	2.98	Ethanolamine ammonia-lyase, large subunit, heavy chain
	KLU26612.1	0.85	4.9	Porin
	KLU23170.1	0.85	1.03	Leucine-, isoleucine-, valine-, threonine-, and alanine-binding protein
	KLU20998.1	0.82	2.57	Bifunctional beta-D-glucosidase/beta-D-fucosidase
	KLU25602.1	0.81	4.14	Exported protein of unknown function
	KLU22947.1	0.81	2.49	Putative diguanylate phosphodiesterase
	KLU22018.1	0.78	1.07	Fused DNA-binding response regulator in two-component regulatory system with GlnL: response regulator
	KLU24012.1	0.76	2.36	Periplasmic binding protein/LacI transcriptional regulator
	KLU20940.1	0.76	5.47	Cyclic di-GMP-binding protein
	KLU23206.1	0.75	1.87	Extracellular ligand-binding receptor

(Continues)

Table 2: Continued

Treatment comparison	Gene label	RNA Log2fold change	Protein	Gene description
	KLU27832.1	0.74	1.7	Glycosyltransferase
	KLU20429.1	0.71	3.59	Segregation and condensation protein B homolog (modular protein)
	KLU22412.1	0.7	2.12	Branched chain amino acid ABC transporter periplasmic ligand-binding protein
	KLU20938.1	0.7	2.75	Cellulose synthase operon C domain protein
	KLU25981.1	0.61	2.34	Methyl-accepting chemotaxis serine transducer
	KLU27868.1	0.55	1.86	ABC-type amino acid transport/signal transduction system, periplasmic component/domain protein
	KLU24445.1	0.53	4.77	Monosaccharide-transporting ATPase
	KLU21015.1	0.51	4.78	Methyl-accepting chemotaxis serine transducer
	KLU25416.1	0.51	4.28	Methyl-accepting chemotaxis sensory transducer
	KLU27493.1	0.49	4.38	Ubiquinol-cytochrome c reductase iron-sulfur subunit
	KLU20226.1	0.47	1.33	Pseudouridine synthase
	KLU21015.1	0.45	4.84	Methyl-accepting chemotaxis protein II
	KLU26973.1	0.44	3.82	Putative signal peptide protein (modular protein)
	KLU23389.1	0.42	1.76	Histone family protein nucleoid-structuring protein H-NS
	KLU23986.1	0.4	4.3	Putative ABC transport system, periplasmic component
	KLU21007.1	0.37	4.04	Glycosyl transferase group 1
	KLU21012.1	0.25	3.94	Periplasmic binding protein/LacI transcriptional regulator

In the comparison glucose (GBwB)/mannitol(MBwB) treatments, the higher proportions of DEG/DPP were observed for the amino acid transport and metabolism (RNA: 21.5% vs Protein: 16.7 %), cell wall biogenesis (RNA: 8% vs Protein: 10 %), carbohydrate transport (RNA: 8.6% vs Protein: 13.6 %), signal transduction (RNA: 7.2% vs Protein: 11 %) and inorganic ion transport and metabolism (RNA: 7.5% vs Protein: 3.5 %)(Figure 4CD). Most of the categories were mainly found in the MBwB treatment, except the categories C, D, H and O. The same distribution was observed in the proteome.

Functional changes induced by growth in nutrient-deprived conditions

The comparison done between the GB and GBwB treatments permitted to identify the genes and/or proteins significantly expressed in the condition deprived in iron and magnesium. On the 1,153 DEG and the 41 DPP identified in the comparison of the GB/GBwB treatments, a total of 621 and 23 were significantly higher in the GB treatment in the transcriptome and proteome, respectively.

Among the most up-regulated genes or the proteins presenting an increased abundance in the GB treatment (Table S2A and B), several appeared involved in ion transport. Indeed, higher signal were observed for ion porin (KLU25682.1; log₂FC:5.5) or transporter (KLU24497.1), ion permease (KLU25664.1; Log₂FC:5.5). All these genes are homologous to genes coding for proteins predicted to allow the incorporation of manganese, magnesium, potassium or phosphorous. Interestingly, the molecular markers supporting these functions were members of the top 5 of the up-regulated genes in the DEG dataset and the most produced in the DPP dataset. A total of 33 genes involved in iron access and storage appeared up-regulated in the nutrient-deprived condition (*i.e.*, GB). Several iron transporter/receptors (TonB and ABC types) were in the top 20 of the most expressed genes (Table S2A and B). Indeed, 5 of the 20 putative TonB receptors detected in the genome of PML1(12) were significantly up-regulated. In addition, a cluster of 9 successive genes (KLU26370.1 to KLU26361.1) encoding a putative siderophore was detected using antiSMASH based on the presence of the gene KLU26365.1 (log₂FC: 4.4) presenting high homology to the *IucA/IucC* system, known in *Escherichia coli* to code for the proteins involved in aerobactin production. In addition, two regions involved in the mobilization of iron from the cell reserve appeared significantly more expressed. The first region is composed of a gene encoding a putative deferrochelatase (KLU25830.1 ; log₂FC:4.5) and several neighbouring genes (KLU25828.1-KLU25831.1) appeared up-regulated. The second region (KLU20274.1- KLU20238.1) is characterized by the presence of a bacterioferritin-associated ferredoxin, iron transporters and a permease, all up-regulated.

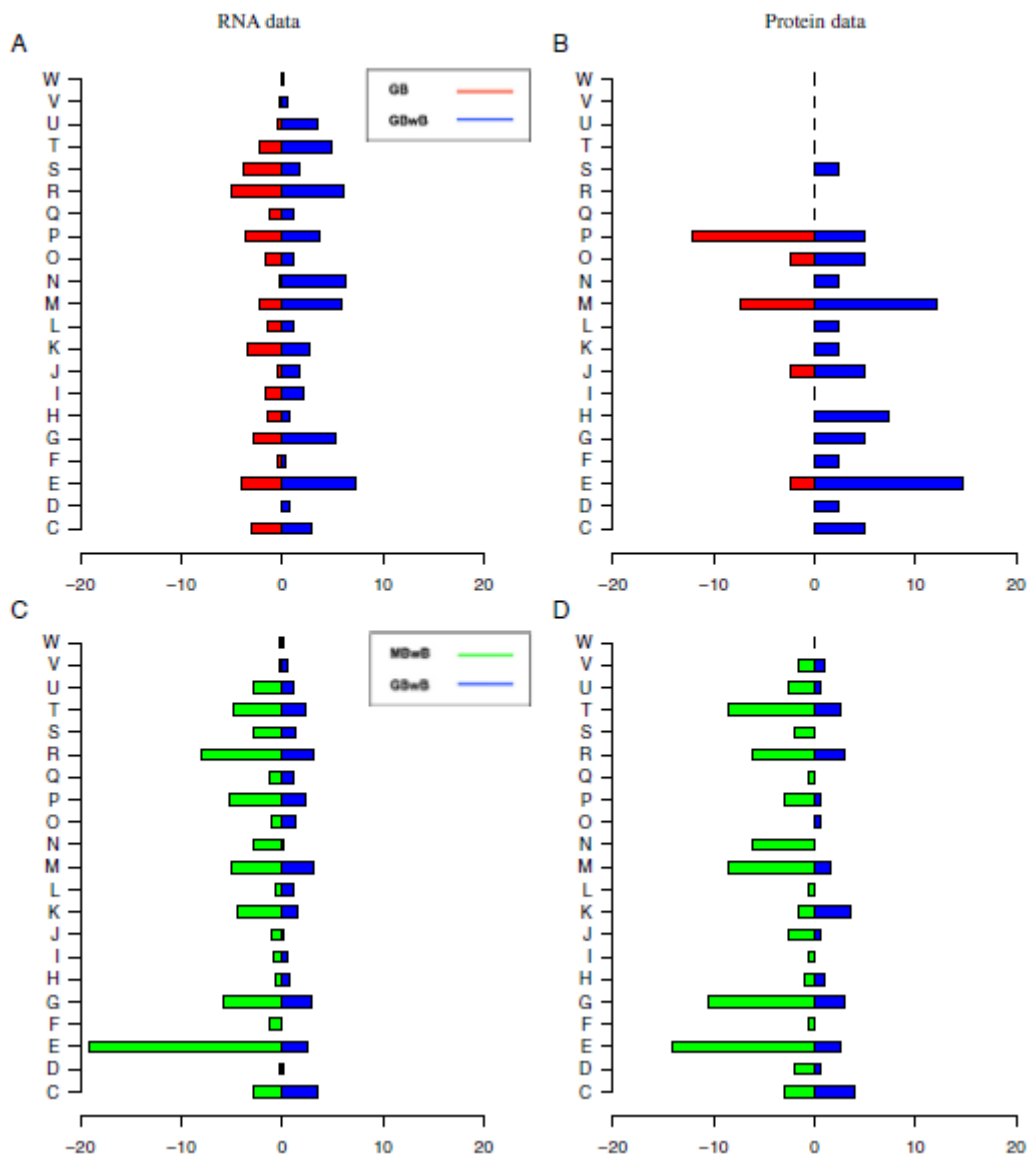


Figure 4: Proportions and Gene Ontology classifications of differentially expressed genes (DEGs) and differentially produced proteins (DPP)

Comparison GB versus GBwB (RNA, A; Protein, B) and comparison of GBwB versus MBwB (RNA, C; protein, D). The detail of the COG categories is presented. A: RNA processing and modification (INFORMATION STORAGE AND PROCESSING); B: chromatin structure and dynamics (INFORMATION STORAGE AND PROCESSING); C: energy production and conversion (METABOLISM); D: Cell cycle control, cell division, chromosome partitioning (CELLULAR PROCESSES AND SIGNALLING); E: amino acid transport and metabolism (METABOLISM); F: nucleotide transport and metabolism (METABOLISM); G: carbohydrate transport and metabolism (METABOLISM); H: coenzyme transport and metabolism (METABOLISM); I: lipid transport and metabolism (METABOLISM); J: translation, ribosomal structure and biogenesis (INFORMATION STORAGE AND PROCESSING); K: transcription (INFORMATION STORAGE AND PROCESSING); L: replication, recombination and repair (INFORMATION STORAGE AND PROCESSING); M: cell wall/membrane/envelope biogenesis (CELLULAR PROCESSES AND SIGNALLING); N: Cell motility (CELLULAR PROCESSES AND SIGNALLING); O: Post-translational modification, protein turnover, chaperones (CELLULAR PROCESSES AND SIGNALLING); P: inorganic ion transport and metabolism (METABOLISM); Q: secondary metabolites biosynthesis, transport and catabolism (METABOLISM); R: general function prediction only (POORLY CHARACTERIZED); S: function unknown (POORLY CHARACTERIZED); T: signal transduction mechanisms (CELLULAR PROCESSES AND SIGNALLING); U: intracellular trafficking, secretion, and vesicular transport (CELLULAR PROCESSES AND SIGNALLING); V: defence mechanisms (CELLULAR PROCESSES AND SIGNALLING); W: Extracellular structures (CELLULAR PROCESSES AND SIGNALLING).

Several of the proteins specified by these genes were also presenting an increased abundance in the comparative proteome analysis as for example the deferrochelatase (KLU25830.1), iron ABC transporter (KLU25829.1, KLU25827.1)(Table S2A and B).

Different genes related to glycogen, glucose and by-product metabolisms appeared up-regulated according to the transcriptome data. Notably, several genes encoding enzymes involved in the synthesis of glycogen and trehalose were detected (Glycogen operon protein homologous to GlgX (KLU21704.1 log₂FC:2.6) ;Glycogen debranching enzyme (KLU25338.1,log₂FC:1.5); Glycogen synthase (KLU25341.1, log₂FC:2.1) ; trehalose-6-phosphate synthase (KLU22111.1; log₂FC:1.8); Malto-oligosyltrehalose synthase (KLU25336.1, log₂FC:2.4) ; Trehalose synthase (KLU25392.1, log₂FC:2)). Among the genes related to glucose metabolism, two regions involved in the production of gluconic acid were detected among the up-regulated genes. The first region corresponds to the locus encoding a flavin adenine dinucleotide (FAD)-dependent enzyme presenting high sequence similarity with a Glucose/methanol/choline (GMC) oxidoreductase. This enzyme (termed GMC1) is composed of three subunits, a large unit (KLU25169.1, log₂FC:1.1), a small unit (KLU25168.1, log₂FC:1) and a cytochrome unit (KLU25978.1, log₂FC:1.1), all the corresponding cistrons being significantly up-regulated. The second region encompasses genes coding for proteins involved in the synthesis of pyrroloquinoline quinone (pqq), which is known to be the cofactor of pqq-dependent enzymes such as the glucose dehydrogenase. Based on sequence similarity, genes pqqA, B, C, D, E as well as several pqq-dependent enzymes were detected in the genome of the strain PML1(12). Three of the pqq-dependent enzymes have as potential substrates methanol (*i.e.*, pqq-dependent methanol DH; KLU21389.1 and KLU25669.1) and glucose (pqq-dependent glucose DH; KLU26637.1), while the substrate for the last one remains undefined (pqq-dependent alcohol DH ; KLU25853.1). Among the cofactor genes, pqqB,C,D and E (1.2 <log₂FC<1.6) were up-regulated in the GB treatment, with a low expression level. For the pqq-dependent enzymes, all were expressed, but only genes KLU25853.1 (Log₂FC:1.3), KLU25669.1 (Log₂FC:0.9) and KLU21389.1 (Log₂FC:0.6) were slightly up-regulated, but poorly expressed. In addition, gene KLU20907.1 encoding a 2,5-diketo-D-gluconic acid reductase (*i.e.*, the enzyme which catalyzes the reduction of 2,5-diketo-D-gluconic acid to 2-keto-L-gulonic acid) appeared significantly up-regulated (Log₂FC:2.2) in the nutrient limited treatment.

Changes induced by growth in nutrient-deprived condition amended with biotite

The comparison done between the GBwB and GB treatments allowed identifying the genes and/or proteins significantly expressed in presence of biotite. However, biotite spontaneously releases nutrients in the medium as observed by comparing the CB and GBwB treatments at the chemical level (Table 1). Consequently, part of the transcriptomics and proteomics changes observed correspond to a sum of mechanisms involved in the perception and adaptation to the presence of the mineral, but also to the different nutrients released in the solution from the biotite (part from the spontaneous dissolution and part related to the mineral weathering ability of strain PML1(12)). Among the DEG and DPP identified molecular players, 532 and 18 were significantly higher in the GBwB treatment (compared to the GB treatment) in the transcriptome and proteome, respectively (Table S3A and B).

A total of 43 genes involved in motility presented a higher expression in presence of the mineral, although no surface adhesion was observed. Notably, 34 genes of a cluster of 38 successive genes (KLU23267.1 to KLU27815.1) are involved in flagella construction and functioning (Table S3A and B). Some of these genes as well as from other genomic regions were present in the top 10 of the most up-regulated genes such as FliS (KLU23268.1, log₂FC:4.4), FliT (KLU23267.1, log₂FC:4.1), flagellin synthesis (KLU23267.1, log₂FC:4.1). Notably, the flagellin synthesis (KLU23267.1) was also found in the proteins presenting an increased abundance (log₂FC:2). In addition to the motility, several genes related to chemotaxis or linking chemotaxis/motility (n=24) were up-regulated. It was notably the case of several genes annotated as CheB,D,E,Y homologs and grouped in the same genomic region (KLU22901.1 to KLU22934.1). Beside the Che related genes, several genes encoding methyl-accepting chemotaxis sensory transducers (n=16) were also up-regulated.

Different genes related to monosaccharides and byproduct metabolisms appeared up-regulated in presence of the mineral according to the transcriptome data, confirming the analyses done at the COG level. Several genes encoding glycosyl transferases such as (e.g., KLU27900.1, KLU27927.1, KLU27959.1, KLU27926.1, KLU27889.1, KLU20777.1, KLU20776.1, KLU20778.1, KLU26149.1, KLU26333.1, KLU26150.1). Among these genes related to glucose metabolism, a region potentially involved in the production of gluconic acid was detected. It corresponded to a flavin adenine dinucleotide (FAD)-dependent enzyme presenting high sequence similarity with a second GMC oxidoreductase. This enzyme (termed GMC2) is composed of three subunits encoding a large unit (KLU25979.1), a small unit (KLU25980.1) and a cytochrome unit (KLU25978.1), all significantly up-regulated (log₂FC:1.1 to 1.9). These genes appeared up-regulated, but expressed at a relatively low level. The GMC2 enzyme

presented sequence identity (21%) with the D-gluconate 2-dehydrogenase large subunit of *Gluconobacter frateurii* (BAH80545.1).

Among the up-regulated genes or proteins, several corresponded to potential reductases involved in the reduction of ammonium (KLU22414.1, log₂FC:2.4), sulfate (KLU22416.1, log₂FC:2.9) and hydroperoxide (KLU26653.1, log₂FC:1.2) and to specific transporters such as gene KLU22692.1 (ammonium transporter, log₂FC:3.5).

Change induced by growth in nutrient-deprived condition amended with biotite and according to the carbon substrate

Previous experiments revealed that strain PML1(12) was very effective at weathering biotite in presence of glucose, but poorly effective with mannitol (Uroz et al., 2007). The mineral weathering data presented above confirmed these observations. Both carbon substrates are preferential substrates used by the strain PML1(12) for its growth, with a tendency to grow better with mannitol. To avoid a growth effect and to test the impact of these substrates, a short-term incubation time (20h) was done using mannitol or glucose. The comparison done between the GBwB and MBwB treatments (i.e., presence of biotite but two C substrates) permitted to identify the genes and/or proteins significantly expressed in the condition deprived in iron and magnesium in relation to the carbon substrate available for the growth of strain PML1(12) (Table S4A and B).

The GBwB and MBwB treatment comparison evidenced significant metabolic changes. On the 1241 DEG and the 198 DPP identified in the comparison of the GBwB/MBwB treatments, a total of 370 and 58 were significantly higher in the GBwB treatment in the transcriptome and proteome, respectively. Several genes related to the pentose phosphate, glycolysis, glyoxylate or Entner-Doudoroff pathways appeared significantly more expressed in the GBwB treatment. Among the most up-regulated genes or in the proteins presenting an increased abundance those involved in gluconate and 2-ketogluconate metabolism and transport are noteworthy (KLU20897.1 to KLU20902.1)(Table S4A and B). The genes KLU20902.1 (log₂FC:4.8) encoding a putative 2-dehydro-3-deoxygluconokinase and KLU20900.1 (log₂FC:4.11) encoding a gluconate-2-dehydrogenase (GADH) were the second and the sixth genes the most up-regulated in the GBwB treatment compared to MBwB, respectively. In addition, several genes encoding GMC oxidoreductases were up-regulated in the transcriptome (GMC1: small (KLU25168.1) / large (KLU25169.1) / cytochrome (KLU25978.1), log₂FC:1.87 for each subunit ; GMC3: cytochrome (KLU25394.1) / large (KLU25343.1) / small (KLU25394.1), log₂FC=1.15 for each subunit), but only the GMC1 (KLU25169.1) presented a significantly increased

abundance in the proteome (log₂FC:5.49). Several other genes related to cytochrome oxidases involved in the proton motive force (PMF) and in the electron transport/respiratory chain appeared also up-regulated (Cytochrome d ubiquinol oxidase subunit II, KLU26331.1; Cytochrome b561, KLU25473.1; Cytochrome c-type biogenesis DsbD type, 1.18 RNA and 1.8 protein). Porin and transporters, and efflux systems were also up-regulated (efflux transporters (KLU24564.1), log₂FC:3.54; porin (KLU23737.1), log₂FC:3.84). Some genes especially related to the transport and mobilization of iron appeared also up-regulated like some iron permeases (KLU20236.1, log₂FC:1.34; KLU25828.1, log₂FC:1.08), bacterioferritin (KLU20274.1, log₂FC:1.13) and an enzyme involved in the mobilization of iron from the cell (*i.e.*, deferrioxalate/ferrioxalate peroxidase EfeN (KLU25830.1, log₂FC:1.69).

Comparatively to the GBwB treatment, a higher number of genes and proteins appeared up-regulated in the MBwB treatment (Table S5A and B). Most of these changes were related to mannitol metabolism, which differs from glucose metabolism. Notably several genes encoding mannitol ABC transporter permeases (KLU22511.1, log₂FC:5.39; KLU22510.1, log₂FC:5.24; KLU22513.1, log₂FC:5.01) appeared highly expressed. The gene and protein encoding a mannitol-2-dehydrogenase were significantly up-regulated (KLU22486.1; log₂FC:4 with RNA and 3.8 with protein). Notably, the different genes encoding the subunits (KLU25980.1, KLU25979.1, KLU25978.1) of the GMC oxidoreductase (GMC2) appeared up-regulated in the transcriptome in MBwB treatment, but with low expression level and log₂FC value of 0.70.

DISCUSSION

To decipher the molecular mechanisms involved in the early stage of the interaction between mineral and bacteria and in the weathering of biotite, we used a combination of transcriptomics, proteomics and (geo)chemistry. The single time-point considered in our study (*i.e.*, 20h) was determined based on preliminary data to be in the early stage of interaction bacteria/mineral/solution at both biological (almost no growth) and mineralogical levels (almost no alteration). Our goal was to reveal the mechanisms activated or repressed as soon as biotite dissolution was quantifiable and with limited cell replication. Indeed, after a longer period, cells have the time to replicate and the system (Mineral/solution/bacteria) is no longer deprived in nutrients. The transcriptomics and proteomics approaches are complementary and provide a more integrative view of the regulated pathways, while the concomitant (geo)chemical analyses tell us about the processes themselves. The RNA-seq approach permitted to identify massively the transcriptional regulatory effects of the different treatments, while proteomics gave access to the most abundant functions activated according to the

treatments considered. Although the depth of analysis was very different between the two methods due to the methodologies, it is noteworthy that both provided a congruent view of the molecular basis of mineral weathering. Indeed, we found significant correlations between the proteins differentially produced (PDP) and the genes differentially expressed (DEG) both using DESeq2 and mixOmics analyses. This good overlap is probably linked to the fact that we considered the early stage of interaction between mineral/bacteria (*i.e.*, a short-term event). Our results revealed the pathways activated or repressed in the presence/absence of mineral and according to the available carbon source. Significant changes in the solution chemistry as well as in the transcriptome and proteome of strain PML1(12) were observed, highlighting that as expected strain PML1(12) was reactive to the presence/absence of mineral in its environment and potentially induced molecular mechanisms involved in the mineral weathering process.

The analyses performed on the solution chemistry revealed a stronger acidification in presence of glucose (pH 2.7) than in presence of mannitol (pH 4.03), confirming previous observations on this strain but obtained after a longer incubation time (*i.e.*, 48h; Uroz *et al.*, 2007). In presence/absence of biotite, strain PML1(12) induced the same acidification. In addition, strain PML1(12) was shown to produce a siderophore independently of the carbon source, but dependent on Fe-depletion. The production of siderophore was not detected in presence of biotite, suggesting that the amount of Fe released spontaneously was sufficient to repress its synthesis. The growth assays revealed no difference in biomass development in the first 20h of bacteria/mineral interaction whatever the treatment, evidencing that the differences measured in our setup were not attributable to putative differences in cell growth. After longer incubation times, a growth lag was observed, evidencing the long-term impact of iron and magnesium depletion on the physiology of the bacterial strain. Together with this stronger acidification, we measured a significantly higher dissolution of biotite in the glucose (GBwB) than in the mannitol (MBwB) treatment as revealed by the quantities of iron and magnesium released in the solution. Those results further confirm the strong connection between bacterial metabolism and mineral weathering (Mapelli *et al.*, 2012 ; Uroz *et al.*, 2009). Gluconic acid appeared as the main organic acid detected in presence of glucose as carbon source, while it was almost absent in the mannitol treatment. Notably, significantly higher concentrations of gluconic acid was measured in the treatment without mineral (*i.e.*, GB; Fe and Mg depleted) than with mineral (*i.e.*, GBwB; Fe and Mg released from biotite). Those results suggest that Mg- and Fe-dependent metabolic regulations occur in strain PML1(12). This is congruent with the results of Sasnow *et al.* (2016) showing that when a *Pseudomonas* strain was grown in Fe-repleted conditions, glucose was mostly converted into biomass and CO₂ (96%), while in Fe-depleted

conditions it was mostly converted into gluconate (40%), siderophore (10%) and, CO₂ (30%) and marginally into biomass (10%). Together our results show that the presence of biotite in the culture medium allows to quantifiable chemical and physiological changes as revealed by the differences in the solution chemistry and the differential production of siderophore and organic acids.

Due to the depletion of the culture medium in iron and magnesium, the up-regulation of molecular mechanisms involved in the mobilization of iron was expected. While the ability to weather mineral is well known for strain PML1(12), its ability to produce chelating agents was never investigated at both chemical and genomic levels. Interestingly, the transcriptome and proteome analyses revealed that several genes/proteins involved in iron mobilization and transport were up-regulated in the GB treatment. Beside the different transporters and permeases, two main pathways were identified. The first one corresponded to the mechanisms involved in the access to extra-cellular iron. A cluster of genes encoding a putative siderophore appeared among the most up-regulated genes in the Fe-depleted treatment (GB). The siderophore characteristics of this cluster were confirmed by an antiSMASH analysis on the genome, which revealed the presence of *IucA/IucC* homologs. The *IucA/IucC* genes encode a non-ribosomal peptide synthetase (NRPS)-independent siderophore (NIS) synthetase, which is responsible of the condensation of citrate, or a derivative molecule, with an amine or alcohol group, and last of the displacement of a citryl intermediate (Carroll and Moore, 2018). In PML1(12) the gene found presented high sequence similarity (26.5%) with the N(2)-citryl-N(6)-acetyl-N(6)-hydroxylysine synthase (*iucA*) and the aerobactin synthase (*iucC*) of *E. coli*. NIS synthetases produce non-peptidic siderophores such as aerobactin, rhizobactin or woodybactins (Challis, 2005; Carmichael *et al.* 2019 ; Lynch *et al.*, 2001 ; de Lorenzo *et al.*, 1986 ; Carroll and Moore, 2018). A similar system was also reported as up-regulated by Olsson-Francis *et al.* (2010) considering the strain *Cupriavidus metallidurans* CH34 growing in Fe depleted environment compared to the same condition amended with obsidian. Notably, the exact same gene organization found in PML1(12) was observed in the genome of several strains of *Pseudomonas*, *Massilia*, *Rashtonia* or *Sinorhizobium* and in some *Burkholderia* (considering *Burkholderia*, *Caballeronia* and *Paraburkholderia*). The antiSMASH analysis did not identify other siderophore systems such as non-ribosomal peptide synthetases (NRPS) in the genome of the strain PML1(12), suggesting that this gene cluster is the only one involved in the production of a siderophore. The second pathway up-regulated in strain PML1(12) corresponded to mechanisms involved in the re-mobilization of intra-cellular iron (Andrews *et al.*, 2003). Indeed, several enzymes involved in the mobilization of iron from the cell reserves such as

bacterioferritin-associated thioredoxin and deferriochelatase appeared up-regulated in both transcriptome and proteome datasets. Notably, these enzymes have been described to allow for the storage of this element in bacterioferritin in excess of iron to protect the cell against iron toxicity, and to perform the reverse reaction in nutrient-poor conditions (Andrews *et al.*, 2003). Together, these data show that under Fe-depletion, strain PML1(12) activates different molecular mechanisms which may participate in its ability to live in nutrient limited conditions and are potentially involved in the first step of the mineral weathering process.

As the production of gluconic acid appeared significantly more important in absence of biotite in the culture medium, a specific focus was done on the genes and proteins related to glucose metabolism which regulation was increased compared to the GBwB treatment. This survey evidenced two important modifications in the cell functioning. The first was related to the up-regulation of genes involved in carbon storage. Indeed, several genes involved in glycogen and trehalose production were up-regulated in the GB treatment. These two carbohydrates are polymers of glucose produced by bacteria as storage compounds. Glycogen and trehalose are usually produced when carbon is abundant but another nutritive element required for growth is limiting (Argüelles, 2000; Preiss and Romeo, 1994). The up-regulation of these genes in our experiments clearly evidences the physiological changes induced by Fe and Mg depletion. The second modification is linked to the production of gluconic acid. From the literature, the gluconic acid is usually produced by glucose deshydrogenase (GDH), which releases protons jointly with the production of the gluconic acid. Glucose is usually oxidized in the periplasm to gluconate and partially further oxidized to 2-ketogluconate (Hanke *et al.*, 2013). The PQQ-dependent GDHs are suspected to be key enzymes involved in mineral weathering (Babu-Khan *et al.*, 1955; Golstein *et al.*, 1995; Wang *et al.*, 2020). The genome of strain PML1(12) contains several enzymes related to GDH, some pyrroloquinoline quinone (PQQ)-dependent and some other non-PQQ dependent. Concerning the PQQ-dependent enzymes, this strain possesses three identified enzymes as well as a suite of *pqq* genes (A to E) encoding the PQQ cofactor. All these genes (excepted *pqqA*) showed a significant up-regulation in GB than in GBwB, but supported by a low expression level. The potential regulation of the PQQ system was reported for some bacterial strains (An and Moe, 2016; Wang *et al.*, 2020), but other studies suggested that it may be a constitutive mechanism (Zheng *et al.*, 2017). Concerning the PQQ-independent enzymes, a total of 4 GMC oxidoreductases were detected in this study in the genome of strain PML1(12). These enzymes depend on FAD as co-factor and allow the production of gluconic acid from glucose. In the depleted treatment (GB), only the GMC1 (small subunit (KLU25168.1); large subunit (KLU25169.1) and cytochrome subunit (KLU25978.1)) appeared

significantly up-regulated, supported by a high expression level. In addition, a 2,5-diketo-D-gluconic acid reductase was also significantly up-regulated in the depleted treatment (GB>GBwB). This enzyme is involved in the transformation of 2,5 ketogluconic acid into 2 ketogluconic acid. The ionic chromatographic analyses done in this study did not allow to distinguish between the different forms of gluconic acid produced (*i.e.*, gluconic acid, 2 ketogluconic acid, 5 ketogluconic acid, or 2,5 ketogluconic acid) by strain PML1(12). However, we showed that strain PML1(12) is capable of using gluconic acid, 2-ketogluconic acid and 5-ketogluconic acid as carbon sources (2,5 ketogluconic acid was not tested), suggesting that this strain produces the different forms and is capable of metabolizing them. Genomic analyses done in this study suggest that strain PML1(12) is capable of forming gluconic acid through two types of GDH depending on two types of co-factors: PQQ or FAD. However, the GMC oxidoreductase showed a far higher expression level than the PQQ-dependent GDH and differential expression in the depleted condition (*i.e.*, GB). The down-regulation of a GMC oxidoreductase was also reported for another strain of *Burkholderia* (*B. multivorans* WS-FJ9) when phosphate concentration increased in the culture medium, but its function was not investigated (Zheng *et al.*, 2017). Together, our data suggest that this pathway may be the main one involved in the production of gluconic acid in strain PML1(12) in our experimental conditions.

The comparison made between the GB and GBwB treatments highlighted the potential molecular mechanisms activated in presence of biotite both using specific (*i.e.*, RNA or Protein) or combined (*i.e.*, RNA + Protein) analyses. Transcriptome analysis of these treatments revealed that 12.6% of the genes were differentially expressed between these treatments, and half of them (532 genes; 5.8%) were up-regulated in presence of the mineral. At the COG level, the stronger differences between the two treatments (GB vs GBwB) were related to cell motility, cell wall/membrane/envelope biogenesis and carbohydrate metabolism and signal transduction, suggesting important physiological changes in the strain PML1(12) due to the presence of the mineral. The detailed analyses of the DEG confirmed these observations, with a notable increase of the expression of genes involved in flagellum construction and functioning, but also of the PML1(12) homologous genes of the chemotaxis Che system (CheA,B,R,W,Z). This system allows bacteria to perceive chemical gradients through methyl-accepting chemotaxis proteins, which then regulate the functioning of the flagellum (Wadhams and Armitage, 2004). Interestingly, a similar increase of the motility and chemotaxis gene expression was also reported in the few studies dealing with bacteria (*i.e.*, *Geobacter metallireducens*, *Cupriavidus metallidurans*) growing in presence of complex minerals or

Fe/Mn oxides (Childers *et al.*, 2002; Olsson-Francis *et al.*, 2010; Bryce *et al.*, 2016). The combined activation of the chemotaxis and motility suggests that PML1(12) can perceive the presence of the mineral and/or of the elements released from its structure and migrates probably to the most nutrient-rich zone (*i.e.*, mineral/solution interface). The question was to determine whether, they form a biofilm on biotite. Cell attachment is known to be determined by several factors such as solution chemistry, pH and quorum sensing communications (Banfield and Nealson, 1997; Yee *et al.*, 2000). In addition bacteria may use molecular mechanisms requiring contact or not with mineral to allow mineral weathering (Olsson-Francis *et al.*, 2010; Wang *et al.*, 2020). However, while the cells are able to migrate to the mineral, our microscopic observations have not evidenced the formation of a PML1(12) biofilm on the biotite particles. In addition, in previous experiments we always observed few cells on the mineral surfaces after paraformaldehyde or alcohol fixation, suggesting that this strain does not form biofilms and is only poorly adherent on the biotite particles under our experimental conditions. Consequently, our results suggest that biotite dissolution induced by strain PML1(12) occurs without stable colonization of the mineral surfaces and potentially through covalent interactions or distant mechanisms.

The specific focus on the treatments with biotite (GBwB and MBwB) allowed us to uncover the physiological changes induced or repressed as a function of the presence of the mineral with two types of carbon source, and to quantify biotite dissolution. From these analyses, it appears clearly that the acidification due to the production of gluconic acid is one of the main mechanisms used by strain PML1(12) to access the nutrients trapped in the mineral. Indeed, when the acidification is limited as in the MBwB treatment, the quantity of gluconic acid is negligible and the dissolution of biotite very low. The genome analysis of strain PML1(12) revealed the presence of a PQQ system and PQQ-dependent dehydrogenases. Indeed, strain PML1(12) harbours the genes *pqqA,B,C,D* and E (KLU25599.1, KLU25560.1- KLU25563.1) and some *pqq*-dependent DH (KLU25669.1: putative methanol DH; KLU21389.1:glucose DH; KLU25669: methanol/ethanol DH). In addition, 4 potential GMC oxidoreductase genes are distributed in the genome: the GMC1 (KLU25168.1), the GMC2 (KLU25978.1), the GMC3 (KLU25394.1) and the GMC4 (KLU26513.1). Three of the GMC oxidoreductases (GMC1-3) detected in the genome of strain PML1(12) are composed of 3 subunits (small, large and cytochrome) and correspond to classical structure of such enzyme type (Cavener, 1992; Yamaoka *et al.*, 2008). The last GMC (GMC4) detected in the genome does not present such organization and did not present significant up- or down-regulation in the transcriptome or proteome. The GMC superfamily encompasses a wide variety of FAD-dependent

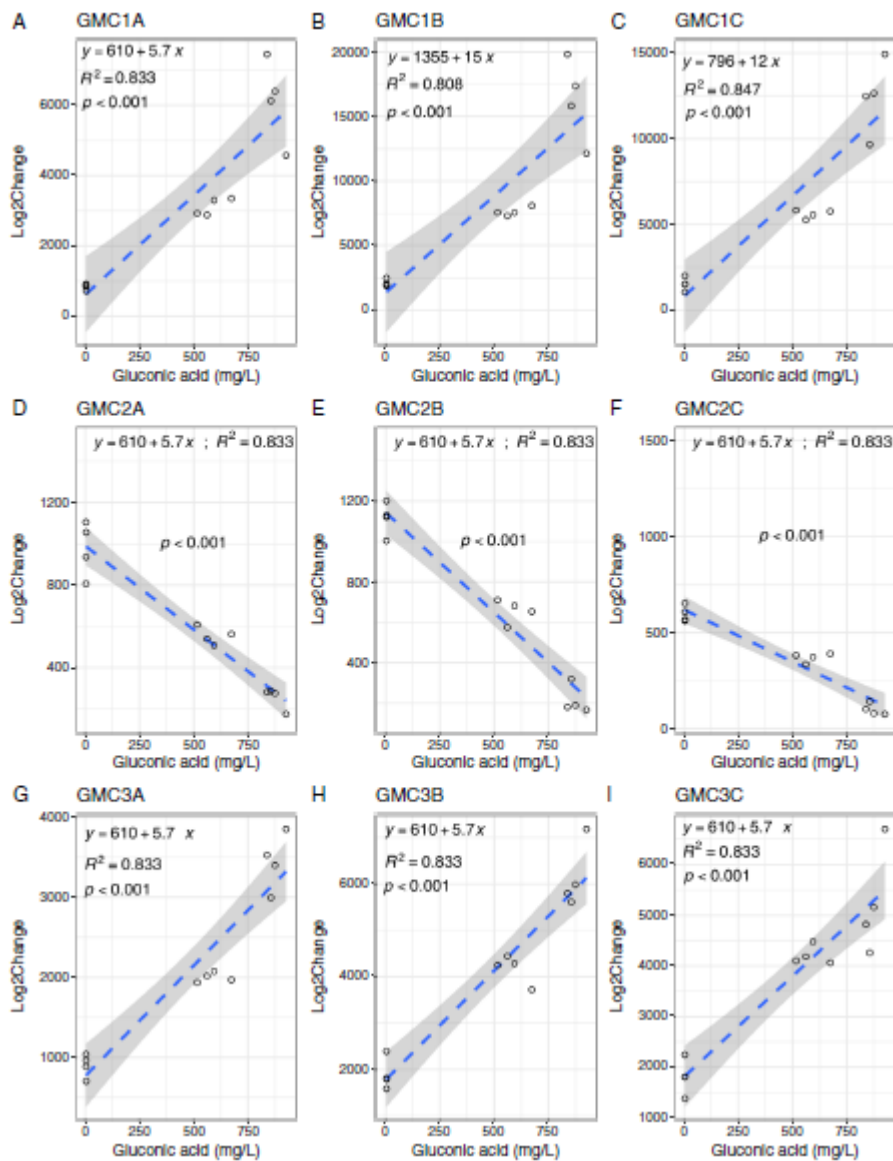


Figure 5: Relationship between gene expression and quantity of gluconic acid measured in solution for the three GMC oxidoreductases (GMC1, GMC2, GMC3)

Here are presented the genes suspected to be involved in the production of gluconic acid, and hence in the MW process. As each GMC is structured into three subunits, the expression of each subunit is presented in line per GMC (1ABC, 2ABC, 3ABC). Linear correlation tests have been done for each data set and the P value, R² and equations are presented.

oxidoreductases such as gluconate dehydrogenase (GADH) glucose dehydrogenase (GDH), fructose dehydrogenase (FDH), sorbitol dehydrogenase (SDH)(Sützl et al., 2019). The sequence comparison of each subunit with one another in our study revealed that the GMC1 and GMC2 presented a high sequence similarity (65%; positive on 75%), while the GMC3 (KLU25394.1) and GMC4 (KLU26513.1) presented a lower similarity (22% and 26%, respectively only on a part of the protein sequence). Although their substrate remains undetermined, part of these GMC enzymes may encode FAD-dependent GDH involved in the production of gluconic acid. In this context, we made a correlation analysis for each FAD- or PQQ-dependent enzyme using the expression data and the chemical analyses done for each replicate and each treatment (Figure 5). These analyses revealed no correlation between the quantity of gluconic acid and the expression level of the *pqq* genes (*pqqB,C,D..*) and the related PQQ-dependent DH. Although the GMC2 (gene KLU25978.1 and related subunits) was poorly expressed compared to the other GMC1 and 3, we observed negative correlations with the quantity of gluconic acid. These negative correlations and the fact that the GMC2 was up-regulated in the treatments with low gluconic acid concentrations suggests that it does not encode for a GDH. In this sense, the GMC2 large subunit has a strong sequence similarity with the D-gluconate 2-dehydrogenase large subunit of *Gluconobacter frateurii*. Its up-regulation would explain the low concentrations of gluconic acid detected in the supernatant in presence of biotite. In contrast, significant positive correlations were observed between the quantity of gluconic acid and the expression of the GMC1 (genes KLU25168.1 and related subunits) and the GMC3 (genes KLU25394.1 and related subunits), which were the GMCs up-regulated in the GB and GBwB treatments, respectively. Thus, our results clearly show that the production of gluconic acid in strain PML1(12) is probably not due to the *pqq* system, but to the GMC1 and 3 oxidoreductases and that the presence of glucose and the nutrient availability (*i.e.*, Fe, Mg) and/or the presence of the biotite, induce a fine tuning of these two GMC enzymes in strain PML1(12). Interestingly, the implication of such enzyme type (*i.e.*, FAD-dependent GDH) in mineral weathering was recently evidenced for collimonads, another representative of the Betaproteobacteria (Picard et al, submitted). This study revealed that though collimonads did not contain *pqq* related genes in their genome, they produce high amount of gluconic acid and protons through the action of a GMC oxidoreductase capable of oxidizing glucose to gluconic acid.

Based on the integration of our data and that of the literature (Olsson-Francis *et al.*, 2010; Bryce *et al.*, 2016; Sasnow *et al.*, 2016; Zeng et al. 2016), we progressed in our understanding of the sequence of events involved in mineral/bacteria interaction and mineral weathering. Although

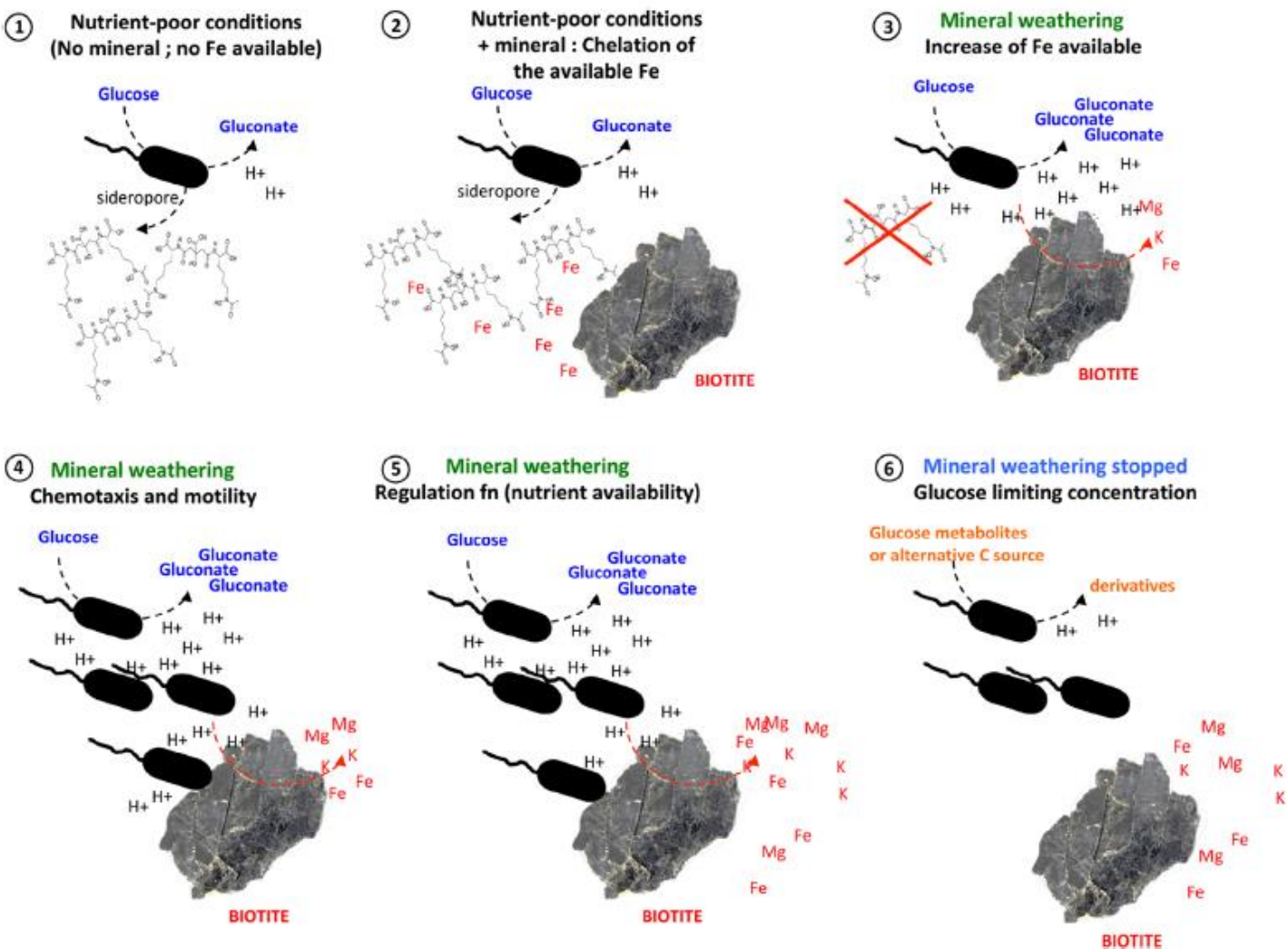


Figure 6: Mechanistic scheme of the early stage mineral weathering by *Caballeronia mineralivorans* strain PML1(12)

The hypothetical functional model presented in here was generated based on the data extracted in this study, previous ones obtained in our group and from data coming from the literature. Step 1: Under nutrient depletion (e.g., Fe, Mg) and in absence of mineral, the bacteria produce gluconate and siderophores. Step 2: In presence of the mineral, the produced siderophores scavenge iron; iron becomes limiting in solution and in Step 3: gluconate, due to the production of gluconic acid by the GMC1 enzyme, induces the acidolysis of the mineral and the release of nutrients (Fe, K, Mg, etc.) from the mineral. The production of siderophores is stopped. Step 4: Upon iron release in the medium, chemotaxis and motility are induced and the bacteria move towards the iron source (i.e. the mineral). Step 5: Upon the increase in nutrients in solution, a complex gene expression regulation occurs. Notably a downregulation of the GMC1 enzyme occurs, while an upregulation occurs for the GMC3 enzyme. Step 6 corresponds to the moment when glucose has been fully metabolized and mineral acidolysis is stopped due to a metabolic switch to gluconate as a carbon source for the bacteria.

additional experiments are required to support the different steps (*i.e.*, other treatments and kinetic analysis), we proposed here a hypothetical functional model of the main mechanisms activated by strain PML1(12) during the early stages of the interaction with the mineral that could pave future experiments (Figure 6). i) The initial stage corresponds to the perception of a nutrient depletion. In such condition, PML1(12) triggers the production of a siderophore, which chelates the iron in solution and scavenges the Fe poorly associated to the mineral surfaces. The activation of the production of siderophore in Fe-depleted conditions was expected, as it is a common mechanism regulated in bacteria according to Fe-availability (Olsson-Francis *et al.*, 2010; Sasnow *et al.*, 2016). At the same time and only in presence of glucose, the bacterial strain activates the pentose phosphate, glycolysis, glyoxylate and Entner-Doudoroff pathways resulting in the production of gluconic acid and the acidification of the solution (Sasnow *et al.*, 2016; Zeng *et al.* 2016). Among the enzymes activated in strain PML1(12), we can point out the GMC1, which activity is increased in Fe-depleted conditions. Such metabolic changes were recently quantified using isotope-assisted metabolomics in the strain *Pseudomonas putida* KT2440 (Sasnow *et al.* 2016). Comparing Fe-repleted and -depleted, these authors showed a reduced growth, a better glucose uptake and an important production of gluconic acid in the Fe-depleted condition. ; ii) when the acidification reaches a threshold in presence of mineral, siderophore production is stopped as the protons released allow for a significant dissolution of the mineral and for the release of sufficient levels of iron and other nutrients in the solution. Siderophore production is known to be inhibited when Fe or a Fe-carrying mineral is added in a Fe-depleted solution (Akers and Holmström, 2014; Olsson-Francis *et al.*, 2010; Sasnow *et al.*, 2016). This raises the question concerning the role of the siderophore in the mineral weathering process. Indeed, as the release of the nutrients entrapped into the mineral occurs spontaneously in aqueous solution and is amplified by the activity of bacteria, we can wonder under which condition siderophores are produced. Indeed, siderophore production is known to be repressed with small amount of iron (*e.g.*, 1mg/L or less)(this study; Sasnow *et al.*, 2016). Consequently, bacteria may use alternative mechanisms to siderophore such as iron uptake systems and particular porins (this study, Olsson-Francis *et al.*, 2010); iii) due to the increase of nutrients in solution (*i.e.*, spontaneous and microbial-increased dissolution), cells activate motility and chemotaxis and are attracted to the mineral/solution interfaces. Interestingly, the strain *Cupriavidus metallidurans* CH34 was also shown to activate motility and chemotaxis in presence of basalt (Olsson-Francis *et al.*, 2010), suggesting that motility and chemotaxis may be common features used by bacteria to interact with and weather minerals; iv) when nutrient availability increases in the solution, strain PML1(12) increases the

activity of a second GMC oxidoreductase (GMC3) identified as a FAD-dependent GDH; and last, v) when the availability in glucose decreases, cells consume the glucose derivatives (gluconic acids and derivatives; Sasnow *et al.*, 2016) and the production of the GMC oxidoreductases is stopped.

CONCLUSION

Using a suite of omic approaches and (geo)chemical analyses, we were able to highlight the significant physiological changes occurring in strain PML1(12) during the early stage of the interaction with minerals. The suite of omics used in our study (*i.e.*, genome analysis, transcriptome and proteome), their high complementarity and their integration provides a comprehensive view of the molecular mechanisms activated or repressed by this bacterial strain as a function of the presence or absence of the mineral. Notably, the genes evidenced in the DESeq2 analysis on the transcriptomics or proteomics datasets were also found in the multivariate approach combining RNA and proteins (*i.e.*, mixOmics), strengthening our conclusions. Our analyses showed that this bacterial strain is well equipped to survive in nutrient-poor environments. Molecular mechanisms involved in iron chelation (NRPS-independent system) and acidification (different types of GDH) appeared up-regulated, but in a different way depending on the presence/absence of the mineral and the availability of Mg and Fe. Noticeably, our study points out that GMC oxidoreductases play a stronger role in the mineral weathering process in the strain PML1(12) than does the PQQ-dependent GDH. To elucidate the dynamics of the next steps of the mineral weathering pathway proposed in our model will require further experimentation and the verification of the role of the different candidate genes identified.

ACKNOWLEDGEMENTS

This work was supported by grants from the EC2CO program of the CNRS and the Labex ARBRE from the French National Research Agency (ANR) to S.U. The UMR1136 and UR1138 are supported by the ANR through the Labex Arbre (ANR-11-LABX-0002-01). L.P. is supported by a PhD fellowship from the French Ministère de l'Enseignement Supérieur, de la Recherche et de l'Innovation. The authors thank : Dr. P. Frey-Klett for helpful discussions, C. Cochet for the geochemical analyses, E. Morin and Dr. L. Auer for bioinformatics and statistical supports; the MICROSCOPE team (David Roche; Genoscope) for the support

provided on the genome and transcriptome management. The authors thank the reviewers #1 and #2 of their helpful comments to improve our manuscript.

REFERENCES

- Ahmed, E., and Holmström, S. J. (2014). Siderophores in environmental research: roles and applications. *Microbial Biotechnology*, 7(3), 196-208.
- Akers, H. A., & Magee, K. P. (1985). The repression of siderophore synthesis by Mt. St. Helens' ash and silicate rock standards. *Experientia*, 41(10), 1354-1355.
- An, R., and Moe, L. A. (2016). Regulation of PQQ-dependent glucose dehydrogenase activity in the model rhizosphere dwelling bacterium *Pseudomonas putida* KT2440. *Applied and Environmental Microbiology*, 82(16), 4955-4964.
- Anders S, Huber W. Differential expression analysis for sequence count data. *Genome Biol.* 2010;11:R106.
- Andrews, S.C., Robinson, A.K., and Rodríguez-Quñones, F. (2003). Bacterial iron homeostasis. *FEMS Microbiology Reviews*, 27(2-3), 215-237.
- April, R., and Newton, R. (1992). Mineralogy and mineral weathering. In *Atmospheric deposition and forest nutrient cycling* (pp. 378-425). Springer, New York, NY.
- Argüelles, J.C. (2000). Physiological roles of trehalose in bacteria and yeasts: a comparative analysis. *Archives of Microbiology*, 174(4), 217-224.
- Babu-Khan, S., Yeo, T. C., Martin, W. L., Duron, M. R., Rogers, R. D., and Goldstein, A. H. (1995). Cloning of a mineral phosphate-solubilizing gene from *Pseudomonas cepacia*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 61(3), 972-978.
- Balland, C., Poszwa, A., Leyval, C., and Mustin, C. (2010). Dissolution rates of phyllosilicates as a function of bacterial metabolic diversity. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 74(19), 5478-5493.
- Banfield, J. F., and Nealson, K. H. (Eds.). (2018). *Geomicrobiology: Interactions between microbes and minerals* (Vol. 35). Walter de Gruyter GmbH and Co KG (manque ville de publi).
- Brantley, S. L. (2008). Kinetics of mineral dissolution. In *Kinetics of water-rock interaction* (pp. 151-210). Springer, New York, NY.
- Bryce, C. C., Le Bihan, T., Martin, S. F., Harrison, J. P., Bush, T., Spears, B., ... and Cockell, C. S. (2016). Rock geochemistry induces stress and starvation responses in the bacterial proteome. *Environmental Microbiology*, 18(4), 1110-1121.
-

- Buch A, Archana G, Naresh Kumar G (2008) Metabolic channeling of glucose towards gluconate in phosphate-solubilizing *Pseudomonas aeruginosa* P4 under phosphorus deficiency. *Res Microbiol* 159(9):635–642.
- Cai, X., Huang, L., Yang, G., Yu, Z., Wen, J., and Zhou, S. (2018). Transcriptomics, proteomics and bioelectrochemical characterization of an exoelectrogen *Geobacter soli* grown with different electron acceptors. *Frontiers in Microbiology*, 9, 1075.
- Calvaruso, C., Turpault, M. P., and Frey-Klett, P. (2006). Root-associated bacteria contribute to mineral weathering and to mineral nutrition in trees: a budgeting analysis. *Appl. Environ. Microbiol.*, 72(2), 1258-1266.
- Calvaruso, C., Turpault, M. P., Frey-Klett, P., Uroz, S., Pierret, M. C., Tosheva, Z., and Kies, A. (2013). Increase of apatite dissolution rate by Scots pine roots associated or not with *Burkholderia glathei* PML1(12)Rp in open-system flow microcosms. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 106, 287-306.
- Carmichael, J. R., Zhou, H., and Butler, A. (2019). A suite of asymmetric citrate siderophores isolated from a marine *Shewanella* species. *Journal of Inorganic Biochemistry*, 198, 110736.
- Carroll, C. S., and Moore, M. M. (2018). Ironing out siderophore biosynthesis: a review of non-ribosomal peptide synthetase (NRPS)-independent siderophore synthetases. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology*, 53(4), 356-381.
- Cavener DR. 1992. GMC oxidoreductases. *Journal of Mol Biol* 223:811–814.
- Challis, G. L. (2005). A widely distributed bacterial pathway for siderophore biosynthesis independent of nonribosomal peptide synthetases. *ChemBioChem*, 6(4), 601-611.
- Childers, S. E., Ciuffo, S., and Lovley, D. R. (2002). *Geobacter metallireducens* accesses insoluble Fe (III) oxide by chemotaxis. *Nature*, 416(6882), 767-769.
- Colin, Y., Nicolitch, O., Turpault, M. P., and Uroz, S. (2017). Mineral types and tree species determine the functional and taxonomic structures of forest soil bacterial communities. *Appl. Environ. Microbiol.*, 83(5), e02684-16.
- Drever, J. I. (1994). The effect of land plants on weathering rates of silicate minerals. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 58(10), 2325-2332.
- Goldstein, A. H. (1995). Recent progress in understanding the molecular genetics and biochemistry of calcium phosphate solubilization by gram negative bacteria. *Biological Agriculture and Horticulture*, 12(2), 185-193.
- González, I., Lê Cao, K. A., Davis, M. J., & Déjean, S. (2012). Visualising associations between paired ‘omics’ data sets. *BioData mining*, 5(1), 19.
-

- Gouveia, D., Grenga, L., Pible, O., & Armengaud, J. (2020). Quick microbial molecular phenotyping by differential shotgun proteomics. *Environmental Microbiology*. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.14975>
- Gyaneshwar P, Parekh L, Archana G, Poole P, Collins M, Hutson R, Kumar GN. 1999. Involvement of a phosphate starvation inducible glucose dehydrogenase in soil phosphate solubilization by *Enterobacter asburiae*. *FEMS Microbiol. Lett.* 171: 223-229.
- Hartmann, E. M., Allain, F., Gaillard, J. C., Pible, O., and Armengaud, J. (2014). Taking the shortcut for high-throughput shotgun proteomic analysis of bacteria. In *Host-Bacteria Interactions* (pp. 275-285). Humana Press, New York, NY.
- Hayoun, K., Gouveia, D. D., Grenga, L., Pible, O., and Armengaud, J. (2019). Evaluation of sample preparation methods for fast proteotyping of microorganisms by tandem mass spectrometry. *Frontiers in microbiology*, 10, 1985.
- Huang, J., Sheng, X. F., Xi, J., He, L. Y., Huang, Z., Wang, Q., and Zhang, Z. D. (2014). Depth-related changes in community structure of culturable mineral weathering bacteria and in weathering patterns caused by them along two contrasting soil profiles. *Appl. Environ. Microbiol.*, 80(1), 29-42.
- Hutchens, E. (2009). Microbial selectivity on mineral surfaces: possible implications for weathering processes. *Fungal Biology Reviews*, 23(4), 115-121.
- Ishige, T., Krause, M., Bott, M., Wendisch, V. F., and Sahm, H. (2003). The phosphate starvation stimulon of *Corynebacterium glutamicum* determined by DNA microarray analyses. *Journal of Bacteriology*, 185(15), 4519-4529.
- Jolivet, C., Angers, D. A., Chantigny, M. H., Andreux, F., and Arrouays, D. (2006). Carbohydrate dynamics in particle-size fractions of sandy spodosols following forest conversion to maize cropping. *Soil Biology and Biochemistry*, 38(9), 2834-2842.
- Koele, N., Turpault, M. P., Hildebrand, E. E., Uroz, S., and Frey-Klett, P. (2009). Interactions between mycorrhizal fungi and mycorrhizosphere bacteria during mineral weathering: budget analysis and bacterial quantification. *Soil Biology and Biochemistry*, 41(9), 1935-1942.
- Landeweert, R., Hoffland, E., Finlay, R. D., Kuyper, T. W., and van Breemen, N. (2001). Linking plants to rocks: ectomycorrhizal fungi mobilize nutrients from minerals. *Trends in Ecology and Evolution*, 16(5), 248-254.
- Li, H., and Durbin, R. (2009). Fast and accurate short read alignment with Burrows–Wheeler transform. *bioinformatics*, 25(14), 1754-1760.
-

- Liermann, L. J., Kalinowski, B. E., Brantley, S. L., and Ferry, J. G. (2000). Role of bacterial siderophores in dissolution of hornblende. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 64(4), 587-602.
- Lepleux, C., Uroz, S., Collignon, C., Churin, J. L., Turpault, M. P., and Frey-Klett, P. (2013). A short-term mineral amendment impacts the mineral weathering bacterial communities in an acidic forest soil. *Research in microbiology*, 164(7), 729-739.
- Lim, C. K., Hassan, K. A., Tetu, S. G., Loper, J. E., and Paulsen, I. T. (2012). The effect of iron limitation on the transcriptome and proteome of *Pseudomonas fluorescens* Pf-5. *PloS one*, 7(6), e39139.
- de Lorenzo, V., Bindereif, A., Paw, B.H., and Neilands, J. B. (1986). Aerobactin biosynthesis and transport genes of plasmid ColV-K30 in *Escherichia coli* K-12. *Journal of Bacteriology*, 165(2), 570-578.
- Love, M. I., Huber, W., and Anders, S. (2014). Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2. *Genome Biology*, 15(12), 550.
- Lynch, D., O'Brien, J., Welch, T., Clarke, P., ÓCuív, P., Crosa, J. H., and O'Connell, M. (2001). Genetic organization of the region encoding regulation, biosynthesis, and transport of rhizobactin 1021, a siderophore produced by *Sinorhizobium meliloti*. *Journal of Bacteriology*, 183(8), 2576-2585.
- Mailloux, B. J., Alexandrova, E., Keimowitz, A. R., Wovkulich, K., Freyer, G. A., Herron, M., Stolz JF, Kenna TC, Pichler T, Polizzotto ML, Dong H, Bishop M, Knappett PS. (2009). Microbial mineral weathering for nutrient acquisition releases arsenic. *Appl. Environ. Microbiol.*, 75(8), 2558-2565.
- Mander C, Wakelin S, Young S, Condon L, O'Callaghan M. 2012. Incidence and diversity of phosphate-solubilising bacteria are linked to phosphorus status in grassland soils. *Soil Biol. Biochem.* 44: 93-101.
- Mapelli, F., Marasco, R., Balloi, A., Rolli, E., Cappitelli, F., Daffonchio, D., and Borin, S. (2012). Mineral–microbe interactions: biotechnological potential of bioweathering. *Journal of Biotechnology*, 157(4), 473-481.
- Medeiros, P. M., Fernandes, M. F., Dick, R. P., and Simoneit, B. R. (2006). Seasonal variations in sugar contents and microbial community in a ryegrass soil. *Chemosphere*, 65(5), 832-839.
- Nicolitch, O., Colin, Y., Turpault, M. P., and Uroz, S. (2016). Soil type determines the distribution of nutrient mobilizing bacterial communities in the rhizosphere of beech trees. *Soil Biology and Biochemistry*, 103, 429-445.
-

- Nicolitch, O., Feucherolles, M., Churin, J. L., Fauchery, L., Turpault, M. P., and Uroz, S. (2019). A microcosm approach highlights the response of soil mineral weathering bacterial communities to an increase of K and Mg availability. *Scientific Reports*, 9(1), 14403.
- Olsson-Francis, K., Van Houdt, R., Mergeay, M., Leys, N., and Cockell, C.S. (2010). Microarray analysis of a microbe–mineral interaction. *Geobiology*, 8(5), 446-456.
- Or, D., Smets, B. F., Wraith, J. M., Dechesne, A., and Friedman, S. P. (2007). Physical constraints affecting bacterial habitats and activity in unsaturated porous media—a review. *Advances in Water Resources*, 30(6-7), 1505-1527.
- Picard L., Turpault, M-P., Oger, P., Uroz, S. A FAD-dependent glucose dehydrogenase confers its mineral weathering ability to *Collimonas pratensis* PMB3(1). Submitted (need to add journal).
- Preiss, J., and Romeo, T. (1994). Molecular biology and regulatory aspects of glycogen biosynthesis in bacteria. *Prog. Nucleic Acid Res. Mol. Biol.* 47:329-399.
- Rohart, F., Gautier, B., Singh, A., & Lê Cao, K. A. (2017). mixOmics: An R package for ‘omics feature selection and multiple data integration. *PLoS computational biology*, 13(11), e1005752.
- Sasnow, S. S., Wei, H., and Aristilde, L. (2016). Bypasses in intracellular glucose metabolism in iron-limited *Pseudomonas putida*. *MicrobiologyOpen*, 5(1), 3-20.
- Schwyn, B., and Neilands, J. B. (1987). Universal chemical assay for the detection and determination of siderophores. *Analytical biochemistry*, 160(1), 47-56.
- Sützl, L., Foley, G., Gillam, E.M.J., Bodén, M., Haltrich, D. (2019). The GMC superfamily of oxidoreductases revisited: analysis and evolution of fungal GMC oxidoreductases. *Biotechnol Biofuels* 12,1–18.
- Sun, Q., Fu, Z., Finlay, R., and Lian, B. (2019). Transcriptome Analysis Provides Novel Insights into the Capacity of the Ectomycorrhizal Fungus *Amanita pantherina* To Weather K-Containing Feldspar and Apatite. *Applied and Environmental Microbiology*, 85(15), e00719-19.
- Uroz, S., Calvaruso, C., Turpault, M. P., Pierrat, J. C., Mustin, C., and Frey-Klett, P. (2007). Effect of the mycorrhizosphere on the genotypic and metabolic diversity of the bacterial communities involved in mineral weathering in a forest soil. *Appl. Environ. Microbiol.*, 73(9), 3019-3027.
- Uroz, S., Calvaruso, C., Turpault, M. P., and Frey-Klett, P. (2009). Mineral weathering by bacteria: ecology, actors and mechanisms. *Trends in microbiology*, 17(8), 378-387.
-

- Uroz, S., Turpault, M. P., Van Scholl, L., Palin, B., and Frey-Klett, P. (2011). Long term impact of mineral amendment on the distribution of the mineral weathering associated bacterial communities from the beech *Scleroderma citrinum* ectomycorrhizosphere. *Soil Biology and Biochemistry*, 43(11), 2275-2282.
- Uroz, S., Kelly, L. C., Turpault, M. P., Lepleux, C., and Frey-Klett, P. (2015). The mineralosphere concept: mineralogical control of the distribution and function of mineral-associated bacterial communities. *Trends in Microbiology*, 23(12), 751-762.
- Uroz, S., and Oger, P. (2015). Draft genome sequence of *Burkholderia* sp. strain PML1 (12), an ectomycorrhizosphere-inhabiting bacterium with effective mineral-weathering ability. *Genome Announc.*, 3(4), e00798-15.
- Uroz, S., and Oger, P. (2017). *Caballeronia mineralivorans* sp. nov., isolated from oak-*Scleroderma citrinum* mycorrhizosphere. *Systematic and Applied Microbiology*, 40(6), 345-351.
- Vallenet, D., Belda, E., Calteau, A., Cruveiller, S., Engelen, S., Lajus, A., et al (2012). MicroScope—an integrated microbial resource for the curation and comparative analysis of genomic and metabolic data. *Nucleic acids research*, 41(D1), D636-D647.
- Vallenet, D., Calteau, A., Mathieu Dubois, M., Amours, P., Bazin, A., Beuvin, M., Burlot, L., Bussell, X., Fouteau, S., Gautreau, G., Lajus, A., Langlois, J., Planel, R., Roche, D., Rollin, J., Rouy, Z., Sabatet, V., Médigue, C. (2019) MicroScope: an integrated platform for the annotation and exploration of microbial gene functions through genomic, pangenomic and metabolic comparative analysis. *Nucleic Acids Research*. 48(D1), D579-D589.
- Vieira, S., Sikorski, J., Gebala, A., Boeddinghaus, R. S., Marhan, S., Rennert, T., et al (2020). Bacterial colonization of minerals in grassland soils is selective and highly dynamic. *Environmental Microbiology*, 22(3), 917-933.
- Wadhams, G. H., and Armitage, J. P. (2004). Making sense of it all: bacterial chemotaxis. *Nature reviews Molecular Cell Biology*, 5(12), 1024-1037.
- Wang, Q., Cheng, C., He, L., Huang, Z., and Sheng, X. (2014). Characterization of depth-related changes in bacterial communities involved in mineral weathering along a mineral-rich soil profile. *Geomicrobiology Journal*, 31(5), 431-444.
- Wang, W., Lian, B., and Pan, L. (2015). An RNA-sequencing study of the genes and metabolic pathways involved in *Aspergillus niger* weathering of potassium feldspar. *Geomicrobiology Journal*, 32(8), 689-700.

- Wang, Y. L., Sun, L. J., Xian, C. M., Kou, F. L., Zhu, Y., He, L. Y., and Sheng, X. F. (2020). Interactions between Biotite and the Mineral-Weathering Bacterium *Pseudomonas azotoformans* F77. *Applied and Environmental Microbiology*, 86(7).
- Xiao, B., Lian, B., and Shao, W. (2012). Do bacterial secreted proteins play a role in the weathering of potassium-bearing rock powder? *Geomicrobiology Journal*, 29(6), 497-505.
- Yamaoka H, Yamashita Y, Ferri S, Sode K. 2008. Site directed mutagenesis studies of FAD-dependent glucose dehydrogenase catalytic subunit of *Burkholderia cepacia*. *Biotechnol. Lett.* 30:1967–1972.
- Yee, N., Fein, J. B., and Daughney, C. J. (2000). Experimental study of the pH, ionic strength, and reversibility behavior of bacteria–mineral adsorption. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 64(4), 609-617.
- Zeng, Q., Wu, X., and Wen, X. (2016). Effects of soluble phosphate on phosphate-solubilizing characteristics and expression of *gcd* gene in *Pseudomonas frederiksbergensis* JW-SD2. *Current Microbiology*, 72(2), 198-206.

SUPPORTING INFORMATION

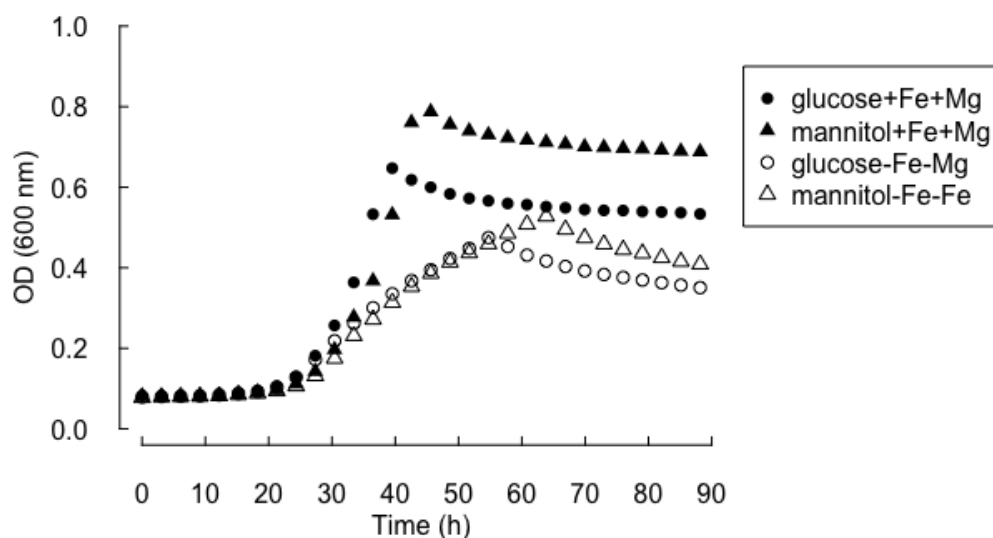


Figure S1: Determination of the growth of the strain PML1(12) according to the carbon source and the iron and magnesium availability. The growth of the strain PML1(12) was measured at 595nm over 5 days. The data presented are the mean of 4 replicates.

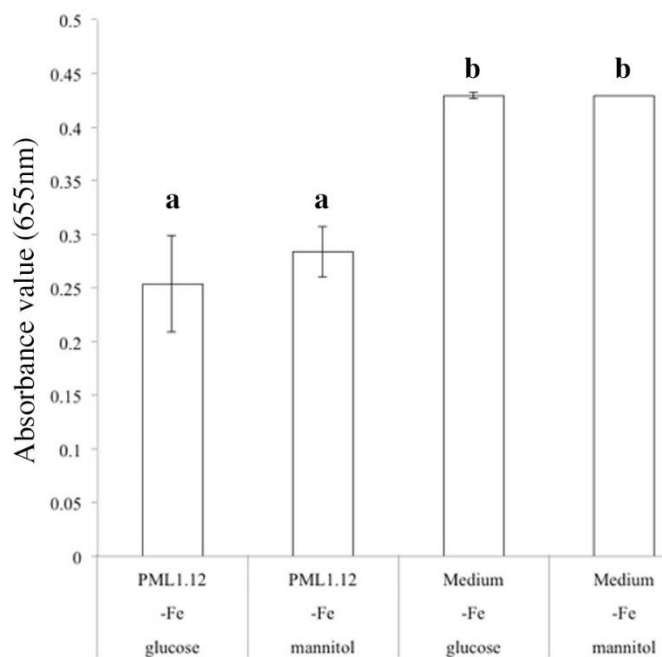


Figure S2 : Siderophore production assay. The supernatant of culture of the strain PML1(12) cultivated without Fe and Mg as well as the equivalent treatments without bacterial inoculation (termed ‘Medium’) were tested with the CAS assay. The data presented correspond to absorbance (655 nm) data. Each value is the mean of four independent replicates \pm the standard error of the mean. Measures with different letters are significantly different according to an ANOVA test ($P < 0.05$).

Table S1A : List of genes evidenced by the Mixomics analysis

(see details in the online version of this article at the publisher's web-site)

Table S2A: List of the 40 most differentially expressed genes in absence of mineral (*i.e.*, gene up-regulated in GB; GB>GBwB). Log2FC:log2fold change. All the data present significant difference of expression according to DESeq2 analysis and a P value <0.00001.

Label	Read count *		log2 FC	Product	COG ID	Class Description
	GB	GBwB				
KLU25664.1	6159	139	5.5	Phosphate import permease protein (PhnE)	S	Unknown function
KLU25682.1	9036	200	5.5	Ion porin	M	Cell wall/membrane/envelope biogenesis
KLU25663.1	40385	1002	5.3	Metal ion transporter, metal ion (Mn ²⁺ /Fe ²⁺) transporter family protein	P	Inorganic ion transport and metabolism
KLU20227.1	11783	299	5.3	TonB-dependent receptor	M	Cell wall/membrane/envelope biogenesis
KLU24497.1	81516	2218	5.2	Manganese transporter	P	Inorganic ion transport and metabolism
KLU24498.1	35678	1198	4.9	Conserved protein of unknown function	S	Unknown function
KLU26216.1	7599	258	4.9	TonB-dependent siderophore receptor	P	Inorganic ion transport and metabolism
KLU20228.1	10621	375	4.8	Biopolymer transport protein (ExbB)	U	Intracellular trafficking, secretion, and vesicular transport
KLU20229.1	9123	355	4.7	Biopolymer transport protein (ExbD1)	U	Intracellular trafficking, secretion, and vesicular transport
KLU25829.1	58777	2474	4.6	Conserved protein of unknown function	P	Inorganic ion transport and metabolism
KLU25857.1	50642	2043	4.6	Ion porin	S	Unknown function
KLU25831.1	72742	2993	4.6	Fe(3+)binding periplasmic protein	M	Cell wall/membrane/envelope biogenesis
KLU25830.1	74295	3274	4.5	Deferrochelatase/peroxidase (EfeN)	P	Inorganic ion transport and metabolism
KLU28191.1	4446	201	4.5	Conserved protein of unknown function	S	Unknown function
KLU26370.1	3005	139	4.4	Ferric siderophore receptor protein	P	Inorganic ion transport and metabolism
KLU25998.1	8776	434	4.3	TonB-dependent siderophore receptor	P	Inorganic ion transport and metabolism
KLU24496.1	14219	787	4.2	Conserved protein of unknown function	S	Function unknown

KLU23737.1	129437	7518	4.1	Porin	M	Cell wall/membrane/envelope biogenesis
KLU25999.1	2039	121	4.1	Conserved protein of unknown function	S	Function unknown
KLU20234.1	11193	719	4	Conserved protein of unknown function	P	Inorganic ion transport and metabolism
KLU26907.1	2246	155	3.9	Conserved protein of unknown function	S	Unknown function
KLU26371.1	1804	124	3.9	Cysteine synthase	E	Amino acid transport and metabolism
KLU26374.1	1663	118	3.8	Diaminopimelate decarboxylase	E	Amino acid transport and metabolism
KLU25828.1	20561	1518	3.8	Fe(3+)transport system permease protein (SfuB)	P	Inorganic ion transport and metabolism
KLU20274.1	16168	1148	3.8	Bacterioferritin-associated ferredoxin	P	Inorganic ion transport and metabolism
KLU26365.1	1863	157	3.6	Siderophore lucA/lucC biosynthesis	Q	Secondary metabolites biosynthesis, transport and catabolism
KLU23676.1	3182	317	3.3	PepSY domain protein	S	Function unknown
KLU26356.1	787	79	3.3	Uncharacterized MFS-type transporter y4xM	P	Inorganic ion transport and metabolism
KLU26359.1	584	60	3.3	ABC-type cobalamin/Fe3+siderophore transport system, ATPase component	P	Inorganic ion transport and metabolism
KLU23823.1	12046	1275	3.2	Conserved protein of unknown function	O	Posttranslational modification, protein turnover, chaperones
KLU26357.1	647	71	3.2	Iron ABC transport system, solute-binding protein	P	Inorganic ion transport and metabolism
KLU25827.1	12119	1321	3.2	Fe(3+) ions import ATP-binding protein (FbpC 1)	E	Amino acid transport and metabolism
KLU26358.1	475	59	3	ABC-type Fe3+siderophore transport system, permease component	P	Inorganic ion transport and metabolism
KLU26143.1	12319	1545	3	RND efflux system, outer membrane lipoprotein	U	Intracellular trafficking, secretion, and vesicular transport
KLU22609.1	20034	2567	3	3deoxy-D-arabinoheptulosonate-7-phosphate synthase, phenylalanine repressible	E	Amino acid transport and metabolism

Table S2B : List of the 40 most differentially produced proteins in absence of mineral (*i.e.*, gene up-regulated in GB; GB>GBwB). Log2FC:log2fold change. All the data present significant difference of expression according to DESeq2 analysis and a P value <0.00001.

Label	Read count		Log2 FC	Product	COG ID	Class Description
	GB	GBwB				
KLU24497.1	13.68	0	6.17	Manganese transporter	P	Inorganic ion transport and metabolism
KLU25682.1	12.84	0	6.09	Ion porin	M	Cell wall/membrane/envelope biogenesis
KLU25830.1	30.65	0.49	5.9	Deferrochelatase/peroxidase (EfeN)	P	Inorganic ion transport and metabolism
KLU25663.1	7.4	0	5.28	Metal ion (Mn ²⁺ /Fe ²⁺) transporter family protein	P	Inorganic ion transport and metabolism
KLU23737.1	4.02	0	4.41	Porin	M	Cell wall/membrane/envelope biogenesis
KLU25827.1	16.7	1.28	3.7	Fe(3+) ions import ATP binding protein (FbpC 1)	E	Amino acid transport and metabolism
KLU25515.1	21.9	2	3.43	Conserved protein of unknown function	S	Unknown function
KLU25831.1	36.96	3.64	3.36	Carbohydrate selective porin	M	Cell wall/membrane/envelope biogenesis
KLU20238.1	17.7	2.81	2.65	Conserved exported protein of unknown function	P	Inorganic ion transport and metabolism
KLU25829.1	55.09	9.43	2.54	Fe(3+)binding periplasmic protein	P	Inorganic ion transport and metabolism
KLU25857.1	33.64	7.16	2.22	Conserved exported protein of unknown function	S	Unknown function
KLU23745.1	29.31	9.39	1.64	Prolin rich exported protein	J	Translation, ribosomal structure and biogenesis
KLU22586.1	149.37	72.09	1.05	Putative periplasmic serine endoprotease DegPlike	O	Posttranslational modification, protein turnover, chaperones
KLU22439.1	110.65	56.64	0.97	Protein chain elongation factor EFG, GTP binding	J	Translation, ribosomal structure and biogenesis
KLU22360.1	45.95	23.62	0.96	Acetyl-ornithine aminotransferase	E	Amino acid transport and metabolism
KLU21713.1	65.89	35.95	0.87	Conserved membrane protein of unknown function	R	General function prediction only
KLU23487.1	46.26	25.41	0.86	Outer membrane protein	M	Cell wall/membrane/envelope biogenesis
KLU21996.1	377.26	222.44	0.76	Phasin family protein	T	Signal transduction mechanisms
KLU21598.1	57.89	34.58	0.74	Transketolase	G	Carbohydrate transport and metabolism
KLU26659.1	296.01	180.06	0.71	Putative phosphoketolase	G	Carbohydrate transport and metabolism
KLU22794.1	203.4	132.99	0.61	Glutamate and aspartate transporter subunit	S	Unknown function
KLU20082.1	101.17	68.37	0.56	NAD-dependent aldehyde dehydrogenase	C	Energy production and conversion
KLU22249.1	467.17	330.83	0.49	Porin	M	Cell wall/membrane/envelope biogenesis

Table S3A: List of the most differentially expressed genes in presence of mineral (*i.e.*, gene up-regulated in GBwB; GBwB>GB). Only the genes with a log2fold change of 3 or more are presented. Log2FC: log2fold change. All the data present significant difference of expression according to DESeq2 analysis and a P value <0.00001.

Label	Read count *		log2 FC	Product	COG ID	Class Description
	GB	GBwB				
KLU26296.1	298	10115	5.1	Acyl coA transferase	C	Energy production and conversion
KLU24196.1	188	4665	4.6	Conserved exported protein of unknown function	W	Extracellular structures
KLU26295.1	95	2325	4.6	Putative metabolite transport protein (NicT)	R	General function prediction only
KLU23268.1	212	4488	4.4	Flagellar protein (FliS)	N	Cell motility
KLU22330.1	2653	49107	4.2	Dihydroxy-acid dehydratase 2	E	Amino acid transport and metabolism
KLU24620.1	369	6491	4.1	Nodulin 21-related protein	S	Function unknown
KLU23267.1	127	2206	4.1	Flagellar protein (FliT)	N	Cell motility
KLU22887.1	1494	25021	4.1	Type I flagellin	N	Cell motility
KLU25777.1	194	3096	4	Nitrate transporter protein (MFS superfamily)	P	Inorganic ion transport and metabolism
KLU23266.1	19	283	3.9	Protein of unknown function	S	Function unknown
KLU23269.1	255	3424	3.7	Flagellar basal-body component	N	Cell motility
KLU22691.1	353	4455	3.7	Regulatory protein, P-II 2, for nitrogen assimilation by	E	Amino acid transport and metabolism
KLU23247.1	70	819	3.6	Flagellar biosynthetic protein (FliO)	N	Cell motility
KLU23235.1	241	2887	3.6	Flagellar component of cell-proximal portion of basal-body rod	N	Cell motility
KLU23236.1	207	2522	3.6	Flagellar component of cell-proximal portion of basal-body rod	N	Cell motility
KLU27016.1	176	1922	3.5	CheW protein	N	Cell motility
KLU23212.1	397	4575	3.5	Anti-sigma-28 factor (FlgM)	K	Transcription
KLU22692.1	1327	15438	3.5	Ammonium transporter	P	Inorganic ion transport and metabolism
KLU27930.1	537	5570	3.4	Conserved protein of unknown function	R	General function prediction only

KLU23246.1	127	1341	3.4	Flagellar motor switching and energizing component	N	Cell motility
KLU23252.1	482	5021	3.4	Flagellar hook-associated protein (FlgK)	N	Cell motility
KLU23234.1	375	4013	3.4	Flagellar hook assembly protein	N	Cell motility
KLU23216.1	470	4933	3.4	GTP-binding signal recognition particle	U	Intracellular trafficking, secretion, and vesicular transport
KLU23434.1	107	1034	3.3	Glycosyl transferase group 1, RfaG-like protein	M	Cell wall/membrane/envelope biogenesis
KLU27862.1	344	3439	3.3	Putative branched-chain amino acid transport protein	E	Amino acid transport and metabolism
KLU23251.1	383	3646	3.3	Flagellar hook-associated protein FlgL	N	Cell motility
KLU27815.1	316	3026	3.3	Flagellar biosynthesis protein FlhG	N	Cell motility
KLU23484.1	150	1360	3.2	F1 sector of membrane-bound ATP synthase (beta subunit)	C	Energy production and conversion
KLU26944.1	2839	26790	3.2	Lysine/arginine/ornithine transporter subunit	E	Amino acid transport and metabolism
KLU27846.1	409	3810	3.2	Glucose-1-phosphate uridylyltransferase	M	Cell wall/membrane/envelope biogenesis
KLU23233.1	643	6108	3.2	Flagellar hook protein	N	Cell motility
KLU23214.1	143	1267	3.2	Flagellar export pore protein	N	Cell motility
KLU21904.1	260	2392	3.2	Glycine C-acetyltransferase	H	Coenzyme transport and metabolism
KLU24991.1	93	825	3.1	Aryl-alcohol dehydrogenase	C	Energy production and conversion
KLU24332.1	165	1449	3.1	Conserved exported protein of unknown function	S	Function unknown
KLU23473.1	143	1248	3.1	Threonine dehydrogenase-like Zn-dependent dehydrogenase	E	Amino acid transport and metabolism
KLU26285.1	330	2895	3.1	Hydroxymethylglutaryl-CoA lyase (YngG)	E	Amino acid transport and metabolism
KLU25585.1	96	842	3.1	Fructose-1,6-bisphosphatase (class 1 2)	G	Carbohydrate transport and metabolism
KLU25588.1	236	2065	3.1	Ribulose bisphosphate carboxylase (large chain)	G	Carbohydrate transport and metabolism
KLU27890.1	347	2943	3.1	Acyltransferase 3	I	Lipid transport and metabolism

KLU27897.1	1358	11642	3.1	FAD dependent oxidoreductase	E	Amino acid transport and metabolism
KLU23245.1	243	2146	3.1	Flagellar motor switching and energizing component	N	Cell motility
KLU23232.1	330	2738	3.1	Flagellar component of cell-proximal portion of basal-body rod	N	Cell motility
KLU23217.1	346	2886	3.1	RNA polymerase, sigma 28 (sigma F) factor	K	Transcription
KLU22901.1	99	870	3.1	Two-component system, chemotaxis family (CheY-like)	T	Signal transduction mechanisms
KLU21903.1	252	2239	3.1	Threonine 3-dehydrogenase, NAD(P)-binding	E	Amino acid transport and metabolism
KLU20753.1	1540	12921	3.1	Transcriptional regulator Crp/Fnr family	T	Signal transduction mechanisms
KLU27827.1	506	4419	3.1	Lipopolysaccharide biosynthesis-related glycosyltransferase	M	Cell wall/membrane/envelope biogenesis
KLU23466.1	38	304	3	ATP synthase (epsilon chain 2)	C	Energy production and conversion
KLU26286.1	171	1331	3	Glyoxalase domain-containing protein 5	E	Amino acid transport and metabolism
KLU25774.1	1313	10762	3	Molybdopterin oxidoreductase	C	Energy production and conversion
KLU25776.1	1189	9741	3	Nitrite reductase (large subunit)	C	Energy production and conversion
KLU25778.1	489	3903	3	Uroporphyrinogen-III C-methyltransferase	H	Coenzyme transport and metabolism
KLU25587.1	80	668	3	Ribulose biphosphate carboxylase (small chain)	G	Carbohydrate transport and metabolism
KLU27889.1	277	2210	3	Glycosyl transferase group 1	M	Cell wall/membrane/envelope biogenesis
KLU23213.1	306	2500	3	FlgN family protein	N	Cell motility
KLU20755.1	687	5507	3	Polysaccharide export outer membrane protein	M	Cell wall/membrane/envelope biogenesis
KLU26296.1	298	10115	5.1	Acyl coA transferase	C	Energy production and conversion

Table S3B: List of the 40 most differentially produced proteins in presence of mineral (*i.e.*, gene up-regulated in GBwB; GBwB>GB). Log2FC: log2fold change. All the data present significant difference of expression according to DESeq2 analysis and a P value <0.00001.

Label	Read count *		log2 FC	Product	COG classID	Class Description
	GB	GBwB				
KLU22415.1	0.44	9.01	4.26	Conserved protein of unknown function	S	Function unknown
KLU27581.1	3.12	50.62	4.04	Ribonucleoside diphosphate reductase (alpha subunit)	F	Nucleotide transport and metabolism
KLU23206.1	0.44	6.84	3.87	Extracellular ligand-binding receptor	E	Amino acid transport and metabolism
KLU23781.1	1.16	14.19	3.59	Putative UDP-N-acetylglucosamine 1-carboxyvinyltransferase	M	Cell wall/membrane/envelope biogenesis
KLU22416.1	1.47	10.53	2.88	Thioredoxin-dependent 5'-adenylylsulfate reductase	H	Coenzyme transport and metabolism
KLU22417.1	2.87	20.71	2.86	sulfate adenylyl transferase, subunit 2	H	Coenzyme transport and metabolism
KLU24617.1	1.65	11.54	2.81	Hopanoid biosynthesis associated radical SAM protein HpnJ	C	Energy production and conversion
KLU22330.1	24.38	137.42	2.51	Dihydroxy-acid dehydratase 2	E	Amino acid transport and metabolism
KLU27902.1	5.33	29.29	2.44	Putative tyrosine-protein kinase EpsB	M	Cell wall/membrane/envelope biogenesis
KLU22026.1	4.98	26.49	2.42	Hydroxymethylpyrimidine moiety synthesis in thiamin biosynthesis	H	Coenzyme transport and metabolism
KLU22414.1	7.08	37	2.39	Ferredoxin--nitrite reductase	P	Inorganic ion transport and metabolism
KLU21742.1	2.84	14.75	2.38	ATP-dependent RNA helicase RhlE	L	Replication, recombination and repair
KLU27932.1	3.73	15.91	2.08	EPS I polysaccharide export outer membrane protein (EpsA)	M	Cell wall/membrane/envelope biogenesis
KLU22887.1	3.72	14.86	2.04	Type I flagellin	N	Cell motility
KLU22418.1	10.45	37.77	1.86	sulfate adenylyltransferase, subunit 1	P	Inorganic ion transport and metabolism
KLU25208.1	3.79	13.44	1.83	Porin	M	Cell wall/membrane/envelope biogenesis
KLU20980.1	12.3	40.43	1.74	Fe-S oxidoreductase	C	Energy production and conversion

KLU27505.1	69.21	205.39	1.57	Protein chain elongation factor EF-G, GTP-binding	J	Translation, ribosomal structure and biogenesis
KLU25201.1	21.45	51.15	1.24	Porin, Gram-negative type	M	Cell wall/membrane/envelope biogenesis
KLU26653.1	12.83	29.45	1.2	Alkyl hydroperoxide reductase (C22 subunit) (detoxification of hydroperoxides)	O	Posttranslational modification, protein turnover, chaperones
KLU22519.1	13.21	29.71	1.16	Chaperone SurA	O	Post-translational modification, protein turnover, chaperones
KLU27452.1	42.86	94.85	1.14	Glutamate synthase, large subunit	E	Amino acid transport and metabolism
KLU22330.1	53.45	107.67	1.01	Phosphogluconate dehydratase (6-phosphogluconate dehydratase)	G	Carbohydrate transport and metabolism
KLU22650.1	26.88	48.54	0.86	2-keto-4-hydroxyglutarate aldolase (KHG-aldolase)	G	Carbohydrate transport and metabolism
KLU20443.1	129.06	174.74	0.44	2-Oxoglutarate decarboxylase, thiamin-requiring	C	Energy production and conversion
KLU25166.1	266.33	357.78	0.43	Porin	M	Cell wall/membrane/envelope biogenesis

Table S4A: List of the 40 most differentially expressed genes in presence of mineral and according to the carbon source (i.e., gene upregulated in GBwB; GBwB>MBwB). Log2FC: log2fold change. All the data present significant difference of expression according to DESeq2 analysis and a P value <0.00001.

Label	Read count *		log2 FC	Product	COG classID	Class Description
	GBwB	MBwB				
KLU20278.1	7267.922	243.161	4.90	Conserved exported protein of unknown function	S	Unknown function
KLU20902.1	30556.387	1098.988	4.8	2-dehydro-3-deoxygluconokinase	G	Carbohydrate transport and metabolism
KLU23823.1	1361.148	52.861	4.68	Conserved protein of unknown function	O	Posttranslational modification, protein turnover, chaperones
KLU20903.1	24765.184	1158.048	4.42	Xylose isomerase domain protein TIM barrel	G	Carbohydrate transport and metabolism
KLU26144.1	8512.218	480.604	4.15	Conserved exported protein of unknown function	S	Unknown function
KLU20900.1	30943.071	1791.342	4.11	2-oxo-carboxylic acid reductase (glyoxalate reductase) (2-ketoaldonate reductase)	H	Coenzyme transport and metabolism
KLU20901.1	31150.976	1834.084	4.09	Major facilitator superfamily (MFS) 2-ketogluconate transporter	G	Carbohydrate transport and metabolism
KLU25588.1	2206.969	134.676	4.03	Ribulose biphosphate carboxylase (large chain)	G	Carbohydrate transport and metabolism
KLU25587.1	713.497	43.674	4.02	Ribulose biphosphate carboxylase (small chain)	G	Carbohydrate transport and metabolism
KLU20307.1	1430.099	98.491	3.86	Exported protein of unknown function	S	Unknown function
KLU23737.1	8024.848	561.815	3.84	Porin	M	Cell wall/membrane/envelope biogenesis
KLU26141.1	1590.249	111.327	3.84	Putative RND family efflux transporter, MFP subunit	M	Cell wall/membrane/envelope biogenesis
KLU25585.1	899.593	66.471	3.75	Fructose-1,6-bisphosphatase (class I 2)	G	Carbohydrate transport and metabolism
KLU26331.1	19148.397	1480.186	3.69	Cytochrome d ubiquinol oxidase (subunit II)	C	Energy production and conversion
KLU23736.1	1950.606	153.806	3.66	Outer membrane protein assembly factor BamA	M	Cell wall/membrane/envelope biogenesis
KLU26354.1	31132.008	2530.137	3.62	Ubiquinol oxidase subunit I, cyanide insensitive	C	Energy production and conversion

KLU25586.1	706.691	57.413	3.62	ATP-binding protein CfxQ homolog	O	Posttranslational modification, protein turnover, chaperones
KLU24564.1	2472.797	213.176	3.54	Efflux transporter, RND family (MFP subunit)	M	Cell wall/membrane/envelope biogenesis
KLU25459.1	3001.99	265.007	3.5	Oxidoreductase molybdopterin binding protein	R	General function prediction only
KLU20340.1	5873.276	529.599	3.47	Protein of unknown function	S	Unknown function
KLU25473.1	3301.434	303.606	3.44	Cytochrome b561	C	Energy production and conversion
KLU25460.1	7208.519	683.488	3.40	Conserved exported protein of unknown function	S	Unknown function
KLU26143.1	1649.709	164.515	3.32	RND efflux system, outer membrane lipoprotein	U	Intracellular trafficking, secretion, and vesicular transport
KLU21383.1	4756.994	483.459	3.3	Cation/multidrug efflux pump	V	Defense mechanisms
KLU26142.1	2925.88	317.57	3.2	Cation efflux system protein (CzcA)	P	Inorganic ion transport and metabolism
KLU26448.1	2477.335	270.702	3.19	Efflux transporter, outer membrane factor lipoprotein, NodT family	U	Intracellular trafficking, secretion, and vesicular transport
KLU21381.1	2843.73	312.197	3.19	Putative Type 11 methyltransferase	Q	Secondary metabolites biosynthesis, transport and catabolism
KLU21382.1	1829.172	203.97	3.16	RND family efflux transporter (MFP subunit)	M	Cell wall/membrane/envelope biogenesis
KLU26296.1	10804.911	1232.136	3.13	L-carnitine dehydratase/bile acid-inducible protein F	C	Energy production and conversion
KLU25568.1	1960.738	225.492	3.12	Conserved putative exported protein of unknown function	S	Unknown function
KLU20673.1	2900.414	336.077	3.11	Conserved putative exported protein of unknown function	S	Unknown function
KLU24077.1	15556.311	1835.077	3.08	Cytochrome c, class I	C	Energy production and conversion
KLU25584.1	486.302	59.683	3.02	Phosphoribulokinase	C	Energy production and conversion
KLU27009.1	17464.852	2262.392	2.95	Conserved protein of unknown function	S	Unknown function
KLU23629.1	1651.567	215.033	2.94	Conserved exported protein of unknown function	S	Function unknown
KLU24649.1	13296.331	1954.566	2.77	Amino acid ABC transporter substrate-binding protein, PAAT family	E	Amino acid transport and metabolism
KLU23814.1	1562.823	229.839	2.77	Conserved protein of unknown function	S	Unknown function

KLU24489.1	6381.601	987.199	2.69	Transcriptional regulator LacI family	K	Transcription
KLU22955.1	95766.134	14820.497	2.69	Conserved exported protein of unknown function	S	Function unknown
KLU20899.1	6657.463	1033.517	2.69	Arabinose efflux permease family protein	G	Carbohydrate transport and metabolism
KLU20899.1	6381.601	987.199	2.69	Transcriptional regulator LacI family	K	Transcription

Table S4B: List of the most differentially produced proteins in presence of mineral and according to the carbon source (*i.e.*, gene up-regulated in GBwB; GBwB>MBwB). Only the genes presenting a log2fold change of 1 or more are presented. Log2FC: log2fold change. All the data present significant difference of expression according to DESeq2 analysis and a P value <0.00001.

Label	Read count*		log2 FC	Product	COG classID	Class description
	GBwB	MBwB				
KLU20903.1	30.35	0.21	6.81	Xylose isomerase domain protein TIM barrel	G	Carbohydrate transport and metabolism
KLU20899.1	10.21	0	5.96	Transcriptional regulator LacI family	K	Transcription
KLU26140.1	7.72	0	5.55	DNA-binding response regulator in two-component regulatory system with CusS	T	Signal transduction mechanisms
KLU20901.1	7.71	0	5.55	Major facilitator superfamily (MFS) 2-ketogluconate transporter	P	Inorganic ion transport and metabolism
KLU25169.1	7.36	0	5.49	GMC oxidoreductase (GMC1)	E	Amino acid transport and metabolism
KLU26296.1	7.1	0	5.44	L-carnitine dehydratase/bile acid-inducible protein F	C	Energy production and conversion
KLU21903.1	5.77	0	5.13	threonine 3-dehydrogenase, NAD(P)-binding	E	Amino acid transport and metabolism
KLU25588.1	5.06	0	4.96	Ribulose biphosphate carboxylase large chain	G	Carbohydrate transport and metabolism
KLU25978.1	4.66	0	4.83	GMC oxidoreductase (cytochrome c subunit) (GMC1)	C	Energy production and conversion
KLU26139.1	6.88	0.21	4.67	Heavy metal sensor kinase	T	Signal transduction mechanisms
KLU20902.1	46.82	2.42	4.25	2-Dehydro-3-deoxygluconokinase	G	Carbohydrate transport and metabolism
KLU27807.1	2.79	0	4.08	Toxin RTX-I translocation ATP-binding protein	V	Defense mechanisms
KLU25583.1	2.74	0	4.06	Transketolase 1, thiamin-binding	G	Carbohydrate transport and metabolism
KLU25439.1	2.72	0	4.06	Conserved membrane protein of unknown function	C	Energy production and conversion
KLU22432.1	3.76	0.23	3.81	Conserved membrane protein of unknown function	R	General function prediction only

KLU26286.1	3.27	0.23	3.6	Glyoxalase domain-containing protein 5	E	Amino acid transport and metabolism
KLU26285.1	4.91	0.43	3.47	Hydroxymethylglutaryl-CoA lyase YngG	E	Amino acid transport and metabolism
KLU20900.1	59.01	6.44	3.19	2-Oxo-carboxylic acid reductase (glyoxalate reductase) (2-ketoaldonate reductase)	C	Energy production and conversion
KLU22115.1	5.69	0.64	3.11	Conserved protein of unknown function	S	Unknown function
KLU25857.1	7.63	0.89	3.1	Conserved exported protein of unknown function	S	Unknown function
KLU20751.1	6.96	0.89	2.98	Amino acid--[acyl-carrier-protein] ligase	J	Translation, ribosomal structure and biogenesis
KLU27902.1	31.18	5.41	2.53	Putative tyrosine-protein kinase (EpsB)	M	Cell wall/membrane/envelope biogenesis
KLU26354.1	8.51	1.55	2.45	Ubiquinol oxidase subunit I, cyanide insensitive	C	Energy production and conversion
KLU22175.1	6.34	1.35	2.24	ABC-type sugar transport system, permease component	G	Carbohydrate transport and metabolism
KLU25460.1	10.21	2.22	2.19	Conserved exported protein of unknown function	S	Unknown function
KLU22996.1	22.71	5.38	2.08	LysR family transcriptional regulator	K	Transcription
KLU23651.1	9.29	2.47	1.92	Porin Gram-negative type	M	Cell wall/membrane/envelope biogenesis
KLU25461.1	10.32	2.92	1.83	Aldehyde oxidase and xanthine dehydrogenase molybdopterin binding protein	C	Energy production and conversion
KLU27426.1	11.69	3.38	1.8	Thiol:disulfide interchange protein (DsbD)	O	Posttranslational modification, protein turnover, chaperones
KLU25163.1	90.94	26.64	1.77	Acriflavin resistance protein	V	Defense mechanisms
KLU25551.1	14.92	4.64	1.67	DNA-binding response regulator in two-component regulatory system with EnvZ	T	Signal transduction mechanisms
KLU25165.1	23.72	7.6	1.64	Transcriptional regulator	K	Transcription
KLU27456.1	32.75	10.81	1.61	ABC transporter fused ATPase and inner membrane subunits	R	General function prediction only
KLU26103.1	15.06	5.14	1.55	methylmalonate-semialdehyde	C	Energy production and conversion

				dehydrogenase, oxidoreductase protein		
KLU25164.1	27.81	9.8	1.5	Two component transcriptional regulator, winged helix family protein	K	Transcription
KLU25164.1	27.81	9.8	1.5	Two component transcriptional regulator, winged helix family protein	T	Signal transduction mechanisms
KLU25177.1	27.05	9.64	1.5	Oxidoreductase, Zn- dependent and NAD(P)- binding	R	General function prediction only
KLU25161.1	43.96	19.14	1.2	RND efflux system, outer membrane lipoprotein, NodT family	U	Intracellular trafficking, secretion, and vesicular transport
KLU25161.1	43.96	19.14	1.2	RND efflux system, outer membrane lipoprotein, NodT family	M	Cell wall/membrane/envelope biogenesis
KLU21714.1	25.9	12.24	1.08	Putative phage shock protein A, PspA	T	Signal transduction mechanisms
KLU25812.1	24.91	11.77	1.07	2-dehydropantoate 2- reductase	H	Coenzyme transport and metabolism

Table S5A: List of the 40 most differentially expressed genes in presence of mineral and according to the carbon source (*i.e.*, gene up-regulated in MBwB; MBwB>GBwB). Log2FC: log2fold change. All the data present significant difference of expression according to DESeq2 analysis and a P value <0.00001.

Label	Read count*		log2 FC	Product	COG ID	Class Description
	GBwB	MBwB				
KLU26679.1	67.178	5919.444	6.46	Outer membrane transport energization protein ExbB	U	Intracellular trafficking, secretion, and vesicular transport
KLU26680.1	30.743	2692.067	6.45	Outer membrane transport energization protein ExbD	U	Intracellular trafficking, secretion, and vesicular transport
KLU26678.1	64.847	4785.102	6.21	Outer membrane transport energization protein TonB	M	Cell wall/membrane/envelope biogenesis
KLU26735.1	280.347	20620.79	6.2	Aliphatic amidase	R	General function prediction only
KLU26681.1	28.044	1990.337	6.15	Outer membrane transport energization protein ExbD	U	Intracellular trafficking, secretion, and vesicular transport
KLU26682.1	96.07	5547.108	5.85	Conserved exported protein of unknown function	R	General function prediction only
KLU26800.1	118.748	6511.922	5.78	Protein CbbQ	R	General function prediction only
KLU26744.1	30.246	1345.976	5.48	Urease subunit gamma/beta	E	Amino acid transport and metabolism
KLU26683.1	49.857	2120.012	5.41	Transcriptional regulator, XRE family	K	Transcription
KLU22511.1	426.511	17933.278	5.39	Binding-protein-dependent transport systems inner membrane component	G	Carbohydrate transport and metabolism
KLU26799.1	119.462	4757.557	5.32	Von Willebrand factor type A domain protein 1	P	Inorganic ion transport and metabolism
KLU22512.1	436.309	16843.023	5.27	Binding-protein-dependent transport systems inner membrane component	G	Carbohydrate transport and metabolism
KLU22510.1	2262.575	85563.537	5.24	Extracellular solute-binding protein	G	Carbohydrate transport and metabolism
KLU26743.1	28.255	994.388	5.14	Urease accessory protein UreF 1	O	Posttranslational modification, protein turnover, chaperones
KLU26742.1	27.249	881.08	5.02	Urease accessory protein UreE 1	O	Posttranslational modification, protein turnover, chaperones

KLU22513.1	1177.152	38006.365	5.01	Fused maltose transport subunit, ATP-binding component of ABC superfamily	G	Carbohydrate transport and metabolism
KLU22517.1	731.514	23286.106	4.99	HAD-superfamily hydrolase subfamily IA variant3	R	General function prediction only
KLU26740.1	72.674	2154.56	4.89	ABC transporter	R	General function prediction only
KLU23108.1	714.205	21082.003	4.88	Protein of unknown function	S	Unknown function
KLU26741.1	63.326	1733.764	4.78	High-affinity branched-chain amino acid transport ATP-binding protein BraG	E	Amino acid transport and metabolism
KLU26684.1	469.636	12310.506	4.71	Outer membrane receptor proteins	P	Inorganic ion transport and metabolism
KLU25090.1	518.95	11777.21	4.5	Outer membrane porin, OmpC family	M	Cell wall/membrane/envelope biogenesis
KLU26745.1	138.498	2845.495	4.36	Urease subunit alpha 1	E	Amino acid transport and metabolism
KLU26880.1	358.661	6955.112	4.28	ROK family protein	K	Transcription
KLU21109.1	249.422	4779.516	4.26	Conserved exported protein of unknown function	S	Unknown function
KLU21106.1	113.775	2019.235	4.15	putrescine transporter subunit: ATP-binding component of ABC superfamily	E	Amino acid transport and metabolism
KLU26879.1	476.639	8258.951	4.12	ABC-type sugar transport system, ATPase component	G	Carbohydrate transport and metabolism
KLU23078.1	29.645	511.571	4.11	Protein of unknown function	S	Unknown function
KLU22509.1	3030.443	52432.511	4.11	Sorbitol dehydrogenase	Q	Secondary metabolites biosynthesis, transport and catabolism
KLU21102.1	268.883	4566.542	4.09	Gamma-Glu-GABA hydrolase	R	General function prediction only
KLU21107.1	67.367	1142.557	4.08	Putrescine transporter subunit: membrane component of ABC superfamily	E	Amino acid transport and metabolism
KLU27867.1	94.293	1554.924	4.04	putative Urease accessory protein UreD 1	O	Posttranslational modification, protein turnover, chaperones
KLU26878.1	559.122	8981.508	4.01	Ribose ABC transporter membrane protein / mannose ABC transporter	G	Carbohydrate transport and metabolism

				membrane protein / fructose ABC transporter membrane protein		
KLU22486.1	1385.186	22097.746	4	D-arabinitol 4- dehydrogenase	G	Carbohydrate transport and metabolism
KLU25211.1	71.498	1123.478	3.97	Periplasmic component of amino acid ABC-type transporter/signal transduction system	E	Amino acid transport and metabolism
KLU20956.1	75.108	1173.314	3.97	Putative urea ABC transporter, ATP-binding protein UrtE	E	Amino acid transport and metabolism
KLU26746.1	122.815	1905.289	3.96	Urease accessory protein UreG 2	O	Posttranslational modification, protein turnover, chaperones
KLU21108.1	91.818	1404.009	3.93	Putrescine transporter subunit: membrane component of ABC superfamily	E	Amino acid transport and metabolism
KLU26877.1	956.648	14461.062	3.92	Monosaccharide- transporting ATPase	G	Carbohydrate transport and metabolism

Table S5B : List of the 40 most differentially produced proteins in presence of mineral and according to the carbon substrate (*i.e.*, gene up-regulated in MBwB; MBwB>GBwB). Log2FC: log2fold change. All the data present significant difference of expression according to DESeq2 analysis and a P value <0.00001.

Label	Read count *		log2 FC	Product	COG ID	Class Description
	GBwB	MBwB				
KLU26735.1	0	27.62	7.09	Aliphatic amidase	R	General function prediction only
KLU24582.1	0	17.19	6.41	Glycosyl transferase family 28	G	Carbohydrate transport and metabolism
KLU26738.1	0	14.83	6.19	Urea ABC transporter, urea binding protein	E	Amino acid transport and metabolism
KLU26684.1	0	12.14	5.91	Outer membrane receptor proteins	P	Inorganic ion transport and metabolism
KLU24224.1	0	10.93	5.76	Putative terminal quinol oxidase, subunit DoxD	S	Function unknown
KLU24373.1	0	10.29	5.67	Methyl-accepting chemotaxis serine transducer	N	Cell motility
KLU22856.1	0	10.02	5.63	LacI family transcription regulator	K	Transcription
KLU20940.1	0	8.98	5.47	Cyclic di-GMP-binding protein	R	General function prediction only
KLU22517.1	0.26	13.58	5.35	HAD-superfamily hydrolase subfamily IA variant3	R	General function prediction only
KLU27862.1	0.76	33.21	5.34	Putative branched-chain amino acid transport protein (ABC superfamily, peri_bind)	E	Amino acid transport and metabolism
KLU24228.1	0	8.04	5.31	Putative sulfate-binding protein	P	Inorganic ion transport and metabolism
KLU22870.1	0	6.9	5.09	Sulfate transporter subunit	P	Inorganic ion transport and metabolism
KLU22511.1	0	6.25	4.95	Binding-protein-dependent transport systems inner membrane component	G	Carbohydrate transport and metabolism
KLU20959.1	0	6.25	4.95	Branched-chain amino acid ABC transporter substrate-binding protein	E	Amino acid transport and metabolism
KLU26612.1	0	6.03	4.9	Porin	M	Cell wall/membrane/envelope biogenesis
KLU27577.1	0.51	16.36	4.9	Signal recognition particle receptor FtsY	J	Translation, ribosomal structure and biogenesis
KLU21679.1	0.25	9.79	4.88	Extracellular solute-binding protein family 5	E	Amino acid transport and metabolism
KLU21015.1	0	5.79	4.84	Methyl-accepting chemotaxis protein II	N	Cell motility

KLU21104.1	0.29	9.31	4.81	Uncharacterized aminotransferase y4uB	H	Coenzyme transport and metabolism
KLU21015.1	0.25	9.17	4.78	Methyl-accepting chemotaxis serine transducer	N	Cell motility
KLU24445.1	0.52	14.95	4.77	Monosaccharide-transporting ATPase	G	Carbohydrate transport and metabolism
KLU22904.1	1.1	29.96	4.77	Methyl-accepting chemotaxis protein I	N	Cell motility
KLU25776.1	1.54	44.42	4.76	Nitrite reductase, large subunit, nucleotide- and Fe/S-cluster binding	C	Energy production and conversion
KLU25180.1	0	5.37	4.73	Tryptophan 2-monooxygenase	E	Amino acid transport and metabolism
KLU26893.1	0	5.31	4.72	Glutamate synthase (NADPH/NADH) small chain	E	Amino acid transport and metabolism
KLU26541.1	0	5.16	4.67	putative outer membrane porin	M	Cell wall/membrane/envelope biogenesis
KLU24332.1	0	5.11	4.66	conserved exported protein of unknown function	S	Unkown function
KLU26759.1	0	4.93	4.6	putative Glutamate synthase, large subunit region 2 FMN-binding (GlxD)	E	Amino acid transport and metabolism
KLU27811.1	0	4.89	4.6	Outer membrane efflux protein	M	Cell wall/membrane/envelope biogenesis
KLU24227.1	0	4.84	4.59	Conserved exported protein of unknown function	S	Function unknown
KLU22450.1	0	4.87	4.59	Tagatose 6-phosphate aldolase 1, kbaZ subunit	G	Carbohydrate transport and metabolism
KLU27088.1	1.06	22.77	4.38	ABC spermidine/putrescine transporter, periplasmic ligand binding protein	E	Amino acid transport and metabolism
KLU27493.1	0	4.21	4.38	Ubiquinol-cytochrome c reductase iron-sulfur subunit	C	Energy production and conversion
KLU28024.1	0	4.16	4.37	50S ribosomal subunit protein L32	J	Translation, ribosomal structure and biogenesis
KLU26879.1	1.06	22.06	4.33	ABC-type sugar transport system, ATPase component	G	Carbohydrate transport and metabolism
KLU26896.1	0.25	6.74	4.33	D-hydantoinase/dihydropyrimidinase	F	Nucleotide transport and metabolism
KLU22934.1	0.26	6.65	4.32	chemotaxis regulator, protein phosphatase for CheY	N	Cell motility
KLU26449.1	0	4.01	4.31	Multidrug efflux system	V	Defense mechanisms
KLU26880.1	0	4.02	4.31	ROK family protein	K	Transcription
KLU22512.1	0	4.02	4.31	Binding-protein-dependent transport systems inner membrane component	G	Carbohydrate transport and metabolism

Annexe 2 : Milieux de culture

1.1. Milieu AB

20X AB Salts (pour 1 L)		20X AB Buffer (pour 1 L)		10 X Source de carbone (pour 1 L)	
NH ₄ Cl	20 g	K ₂ HPO ₄	60 g	Mannitol ou Glucose	20 g
MgSO ₄ , 7H ₂ O	6 g	NaH ₂ PO ₄ , 2H ₂ O	23 g		
KCl	3 g				
CaCl ₂ , 2H ₂ O	0.2 g				
FeSO ₄ , 7H ₂ O	0.05 g	Ajuster le pH à 7,00			
Stériliser par autoclavage					

Mélanger 800 ml d'eau mQ avec 50 ml de AB Salts (20X), 50 ml AB Buffer (20X) et 100 ml de Source de carbone (10X).

1.2. Milieu LBm

Composition pour 1 L	
Tryptone	10 g
Yeast extract	5 g
NaCl	1 g
Agar	15 g

Stériliser par autoclavage.

1.3. Milieu TCP

Composition pour 1 L	
NH ₄ Cl	5 g
NaCl	1 g
MgSO ₄ , 7H ₂ O	1 g
Glucose	10 g
Ca ₃ (PO ₄) ₂	4 g
Agar	15 g

Ajuster le pH à 6.5 (avant l'ajout de Ca₃(PO₄)₂ ou d'agar, stériliser par autoclavage.

1.4. Milieu CAS

	Solution 1	Solution 2	Solution 3	Solution 4	Solution 5
	PIPES 34.63 g	Glucose 4 g	CAS 0.0905 g	FeCl ₃ 0.0024 g	HDTMA 0.1640 g
	KH ₂ PO ₄ 0.3 g				
	NaCl 0.5 g				
	NH ₄ Cl 1 g				
	MgSO ₄ , 7H ₂ O 0.246 g				
	CaCl ₂ , 2H ₂ O 0.0147 g				
Volume	800 ml	100 ml	75 ml	15 ml	60 ml
	Ajuster le pH à 6.8 Ajouter 15 g d'agar				

Mélanger la **Solution 3** avec la **Solution 4** sous agitation. Puis, ajouter la **Solution (3+4)** à la **Solution 5** sous agitation.

Autoclaver les **Solutions 1, 2** et **(3+4+5)**.

Lorsque la température descend à 70 °C, ajouter 100 ml de **Solution (3+4+5)** dans la **Solution 2** sous agitation. Puis, ajouter la **Solution (2+3+4+5)** à la **Solution 1** sous agitation.

1.5. Milieu BHm

BHm (10 X) (pour 1 L)	Source de carbone (10X) (pour 1 L)
KCl 0.2 g	Glucose 20 g
MgSO ₄ , 7H ₂ O 1.5 g	
NaH ₂ PO ₄ 0.8 g	
Na ₂ HPO ₄ 0.9 g	
(NH ₄) ₂ SO ₄ 0.65 g	
KNO ₃ 1 g	
CaCl ₂ 0.2 g	
FeCl ₃ 0.5 g	
Ajuster le pH à 6.5	

Stériliser par autoclavage.

Mélanger 800 ml d'eau mQ stérile avec 100 ml de BHm (10X) et 100 ml de glucose (10X).

Annexe 3 : Publications et communications scientifiques**Articles scientifiques**

- Picard L., Paris C., Dhalleine T., Morin E., Oger P., Turpault M-P., Uroz S.** 2021. The mineral weathering ability of *Collimonas pratensis* PMB3(1) involves a Malleobactin-mediated iron acquisition system
Environmental Microbiology
vol. ,no ,p.
<http://doi.org/10.1111/1462-2920.15508>
- Picard L., Turpault M-P., Oger P., Uroz S.** 2021. Identification of a novel type of glucose dehydrogenase involved in the mineral weathering ability of *Collimonas pratensis* strain PMB3(1)
FEMS Microbiology Ecology
vol. 97, no 1, p. fiae232.
<https://doi.org/10.1093/femsec/fiae232>
- Picard L., Oger P., Turpault M-P., Uroz S.** 2020. Draft genome sequence of *Collimonas pratensis* strain PMB3(1), an effective mineral-weathering and chitin-hydrolyzing bacterial strain
Microbiology Resource Announcements
vol. 9, no 37, p. e00601-20.
<https://doi.org/10.1128/MRA.00601-20>
- Uroz S., Picard L., Turpault M-P., Auer L., Armengaud J., Oger P.** 2020. Dual transcriptomic and proteomic analyses of the early stage of interaction between *Caballeronia mineralivorans* PML1(12) and mineral
Environnemental Microbiology
vol. 22, no 9, p. 3838-3862.
<https://doi.org/10.1111/1462-2920.15159>
- En cours...*
- Uroz S., Picard L., Turpault M-P.** Recent progress in understanding the ecology of mineral weathering bacteria and molecular mechanisms involved
TRENDS in Microbiology
accepté
- Picard L., Cochet C., Turpault M-P., Uroz S.** Are molecular mechanisms involved in mineral weathering by *Collimonas pratensis* strain PMB3(1) influenced by intrinsic and extrinsic factors ?
- Picard L., Auer L., Armengaud J., Turpault M-P., Uroz S.** Transcriptomic and proteomic approaches to decipher mechanisms involved in interaction and weathering of minerals by *Collimonas pratensis* strain PMB3(1)



Communications scientifiques

Premier prix des posters		Picard L., Turpault M-P., Oger P., Uroz S. 2021. L'acidolyse : un des mécanismes utilisés par <i>Collimonas</i> pour altérer les minéraux	<i>Journée Doc-PostDoc de l'Unité IAM 2021</i>
Premier prix des présentations orales		Picard L. 2020. Identification et caractérisation d'un sidérophore produit par la souche PMB3(1) de <i>Collimonas pratensis</i>	Séminaire Ecole Doctorale SIRENa 2020
Poster		Uroz S., Oger P., Picard L., Armengaud J., Turpault M-P. 2019. Caractérisation transcriptomique et protéomique des déterminants moléculaires de l'altération des minéraux utilisés par la souche PML1(12) de <i>Caballeronia mineralivorans</i>	<i>Colloque AFEM 2019</i>
Poster pitch		Picard L., Turpault M-P., Oger P., Uroz S. 2019. L'acidolyse : un des mécanismes utilisés par <i>Collimonas</i> pour altérer les minéraux	<i>Colloque AFEM 2019</i>
Poster		Picard L., Oger P., Turpault M-P., Uroz S. 2019. Molecular mechanisms involved in mineral weathering ability of <i>Collimonas</i> sp. PMB3(1) isolated from oak- <i>Scleroderma citrinum</i> mycorrhizosphere	<i>Journée Doc-PostDoc de l'Unité IAM 2019</i>

Annexe 4 : Formations réalisées au cours de ma thèse**Formations suivies pendant ma thèse****Médiation scientifique**

Découvrir la médiation scientifique (PA1.4 MDD 41)	<i>Crédits/Points : 0.5</i>
Tous Chercheurs (PA1.4 MDD 46)	<i>Crédits/Points : 1.5</i>
Experimentarium (PA1.4 MDD 48)	<i>Crédits/Points : 1.5</i>
Organisation de la journée des doctorants et post-doctorants de l'unité IAM	<i>Crédits/Points : 1</i>
Organisation du Colloque AFEM 2019	<i>Crédits/Points : 1</i>

Enseignement supérieur

Initiation à l'enseignement universitaire : construire un cours, l'animer, évaluer (PA1.1 MDD 12)	<i>Crédits/Points : 1</i>
48h TP Bactériologie, FST de Nancy (2U02A)	<i>Crédits/Points : 1</i>
32h TP Virologie Bactériologie, FST de Nancy (EC4.03B)	<i>Crédits/Points : 1</i>

Formations transverses

Rédiger, valoriser et publier son travail de recherche (AT2. MDD 12)	<i>Crédits/Points : 1</i>
MOOC Gestion de projet (AT2. MDD 31)	<i>Crédits/Points : 2</i>

Formations disciplinaires

Initiation au logiciel d'analyse de données R	<i>Crédits/Points : 2.5</i>
FROGS	<i>Crédits/Points : 2</i>
Prise de parole en public (AT1. SLTC 04)	<i>Crédits/Points : 0.5</i>

Ethique et intégrité scientifique

Culture de l'intégrité scientifique (AT3. MDD 11)	<i>Crédits/Points : 1</i>
---------------------------------------------------	---------------------------

Langues

Anglais : préparation à l'oral (AT4. MDD 12)	<i>Crédits/Points : 1</i>
----------------------------------------------	---------------------------

Réunions, audition libres

Journée de rentrée SIRENa	
Séminaire Ecole Doctorale SIRENa	

Résumé de thèse vulgarisé :

Dans les sols forestiers, les nutriments tels que le phosphate, magnésium ou fer nécessaires à la croissance des arbres ne sont pas facilement accessibles pour les racines car piégés dans les minéraux et roches. Pour accéder à ces nutriments, les arbres sont entourés au niveau de leurs racines, de partenaires microscopiques comme les bactéries capables de dissoudre les minéraux libérant leurs nutriments et les rendant accessibles aux racines des arbres. Actuellement, les gènes conférant la capacité à altérer les minéraux des sols par les bactéries sont mal connus. Pour les découvrir, les travaux développés dans cette thèse se sont basés sur une souche modèle de bactérie appelée *Collimonas pratensis* PMB3(1) et connue pour dissoudre les minéraux. Cette thèse a permis de découvrir *via* la création de mutants, deux agents altérants : une glucose/méthanol/choline oxidoréductase qui produit des protons et altère les minéraux par acidification et un sidérophore qui altère les minéraux par complexation. Des tests d'altération ont montré que ces agents n'ont pas la même efficacité en fonction des conditions environnementales. Cette thèse offre une meilleure compréhension des mécanismes moléculaires utilisés par les bactéries pour altérer les minéraux.

Mots clés : altération des minéraux, bactéries, génétique, *Collimonas*, glucose/méthanol/choline oxidoréductase, malléobactine

Vulgarized Abstract:

In forest soils, inorganic nutrients such as phosphate, magnesium or iron necessary for tree growth are not easily available for roots because they are entrapped into the structure of minerals and rocks. To access these nutrients, trees are surrounded at their roots by microscopic partners such as bacteria able to dissolve minerals releasing nutrients and make them available for tree roots. Currently, genes involved in mineral dissolution by bacteria are not well known. To discover them, researches developed in this thesis are based on a model bacterial strain called *Collimonas pratensis* PMB3(1) and known to dissolve minerals. This thesis allowed to discover via the building of mutants, two weathering molecules: a glucose/methanol/choline oxidoreductase that produce protons and weather minerals by acidification and a siderophore that weather minerals by complexation. Tests of mineral weathering showed that these molecules have different efficiency according to environmental conditions. To conclude, this thesis offers a new understanding of molecular mechanisms used by bacteria to weather minerals.

Key words: mineral weathering, bacteria, genetic, *Collimonas*, glucose/methanol/choline oxidoreductase, malleobactin