

**Financement Lorraine Université d'Excellence**

**Unités de Recherche :**

UMR 1121 (Laboratoire Agronomie et Environnement),  
UMR 7053 (Laboratoire Lorrain de Chimie Moléculaire)

**Acronyme des unités et adresses de travail du doctorant :**

LAE, 2 avenue de la forêt de Haye, 54518 Vandoeuvre les Nancy  
L2CM, Faculté des Sciences et Technologies, Boulevard des Aiguillettes, 54506 Vandoeuvre-lès-Nancy

**Direction de la thèse assurée par deux encadrants obligatoirement :**

Directeur de thèse : Alain Hehn, PR  
Co directeur de thèse : Dominique Laurain-Mattar, PR  
Co directeur de thèse : Sophie Slezack, MCF

**Titre de la thèse en français :**

Valorisation des interactions plante-microorganismes endophytes pour caractériser de nouvelles molécules actives antimicrobiennes pour les secteurs de l'agrochimie et de la pharmaceutique

**Spécialité du doctorat :**

Sciences Agronomiques

**Mots clés en français – maximum 5 :**

Communautés endophytes, métabolisme spécialisé, composés antimicrobiens, agrochimie, pharmaceutique

**Titre de la thèse en anglais :**

Valorization of endophytic plant-microorganism interactions to characterize new antimicrobial active molecules for the agrochemical and pharmaceutical sectors

**Mots clés en anglais – maximum 5 :**

Endophyte community, specialized metabolism, antimicrobial compounds, agrochemistry, pharmaceuticals

**Correspondant / contact pour faire acte de candidature :**

Alain Hehn, PR UL, HDR  
Courriel : alain.hehn@univ-lorraine.fr

**Date limite de candidature : 30 avril 2018**

**Présentation détaillée du sujet en français**

Depuis la moitié du XX<sup>ème</sup> siècle, le recours aux antibiotiques en santé humaine et aux produits phytosanitaires en santé des plantes a permis de maîtriser efficacement un ensemble de maladies (Brown, 2006 ; Glare et al., 2012 ; Ishii, 2006). L'utilisation généralisée de ces solutions a conduit à la sélection de populations d'agents pathogènes résistantes (Berdy, 2012 ; Ishii, 2006) vis-à-vis desquelles la plupart des antibiotiques et produits phytosanitaires disponibles sont inefficaces. La recherche de nouvelles substances actives est donc une priorité (Sumi et al, 2015). L'une des voies les plus prometteuses pour identifier ces substances actives est d'exploiter les ressources biologiques et en particulier, les microorganismes endophytes associés aux végétaux (McChesney et al, 2007 ; Müller et al, 2016). Ces microorganismes colonisent les tissus internes de la plante (Hardoim et al, 2015). Ils établissent des relations étroites avec la plante, basées sur un dialogue moléculaire complexe et peuvent moduler la croissance et la tolérance des plantes aux stress (Bulgarelli et al, 2012, 2013 ; Lebeis et al, 2015 ; Panke-Buisse et al, 2015). En particulier, ils sont susceptibles de produire une grande diversité de métabolites spécialisés (terpénoïdes, alcaloïdes, peptides...) ou d'intermédiaires de synthèse dont certains identiques à ceux produits par la plante hôte (Hardoim et al, 2015 ; Higginbotham et al, 2013, Khiralla et al., 2016). Les endophytes sont également capables d'influencer le niveau de production de ces métabolites par la

plante (Hardoim et al, 2015). Le méta-organisme constitué par la plante et ses communautés endophytes peut donc être considéré comme un bioréacteur, susceptible de produire une grande diversité de composés bioactifs. Le potentiel que représente ce bioréacteur est encore largement inexploré (Bräder et al, 2014). **L'objectif général du projet est d'exploiter les interactions plante-endophytes afin d'identifier de nouveaux composés antimicrobiens qui pourront être valorisés dans les secteurs pharmaceutique et de l'agrochimie.** Nous faisons l'hypothèse 1/ que la diversité taxonomique des communautés endophytes influence le profil phytochimique et la bio-activité des extraits végétaux et 2/ que les microorganismes endophytes sont un réservoir de nouvelles substances bioactives.

La **première phase du travail** visera à évaluer les relations entre composition taxonomique des communautés endophytes bactériennes et fongiques, profils phytochimiques et activité antimicrobienne d'extraits végétaux, chez des espèces d'intérêt agronomique ou pharmaceutique appartenant aux Brassicacées (*Brassica napus*, *B. rapa*), Amaryllidacées (*Leucojum* sp., *Narcissus* sp.) et Rutacées (*Ruta graveolens*). Afin de faire varier la composition du microbiote endophyte de ces espèces, plusieurs génotypes seront cultivés sur différents types de sol. Les profils phytochimiques des extraits végétaux seront établis par une approche de **métabolomique** par MS et RMN (Deborde et al, 2017 ; Kim et al, 2010). Les activités antimicrobiennes des extraits seront analysées à l'aide de **bio-tests in vitro** en ciblant des agents phytopathogènes et des agents pathogènes humains. La composition taxonomique des communautés endophytes sera analysée par **métagénomique**. Les relations entre profils métaboliques/bio-activité des extraits végétaux/diversité taxonomique des communautés endophytes seront établies à l'aide d'**analyses multivariées**. Ces approches complémentaires permettront de sélectionner les plantes présentant des profils métaboliques et d'activité antimicrobienne contrastés, à partir desquelles les microorganismes endophytes seront isolés.

La **seconde partie** du travail sera consacrée à la **caractérisation taxonomique et fonctionnelle des isolats**. La caractérisation taxonomique sera réalisée par séquençage de l'ADNr 16S (bactéries) et de l'ADNr 18S (champignons). La caractérisation fonctionnelle sera réalisée sur des extraits microbiens à l'aide des bio-tests fonctionnels *in vitro* et à l'aide de tests de co-culture microorganisme(s) endophyte(s)/ agent pathogène cible (Marmann et al., 2014). Les profils métaboliques des extraits microbiens seront analysés par **MS** et par **RMN**, de manière à identifier les molécules à activité antimicrobienne produites par les microorganismes endophytes. Cette seconde partie du travail permettra de sélectionner les souches microbiennes les plus intéressantes d'un point de vue de leurs aptitudes métaboliques.

Dans une **troisième partie** du travail, ces souches seront inoculées en conditions de **co-culture in vitro** sur des explants végétaux, et ce afin de modifier la synthèse de métabolites spécialisés par la plante hôte. Les profils phytochimiques des extraits végétaux seront établis par **MS** et **RMN** et les activités antimicrobiennes des extraits seront analysées à l'aide de bio-tests fonctionnels *in vitro*.

#### **English description of the subject:**

Since the mid-twentieth century, the use of antibiotics in human health and phytosanitary products in plant health has controlled a wide range of human and cultivated plants diseases (Brown 2006, Glare et al. Ishii, 2006). However, the widespread use of these solutions has led to the appearance of resistant pathogen populations (Berdy, 2012, Ishii, 2006) for which most of the available antibiotics and phytosanitary products are now ineffective. The search for new active substances is therefore considered as a priority for managing resistance (Sumi et al, 2015). One of the most promising ways to identify these active substances is to investigate and exploit biological resources and in particular endophytic microorganisms associated with plants (McChesney et al., 2007, Müller et al, 2016). These microorganisms (bacteria and fungi) colonize the internal tissues of the plant (Hardoim et al, 2015). They establish close relationships with the plant, based on a complex molecular interaction and are likely to modulate the growth and tolerance of plants to stress (Bulgarelli et al, 2012, 2013, Lebeis et al, 2015, Panke-Buisse et al, 2015). For example these microorganisms are capable of producing a wide variety of specialized metabolites (terpenoids, alkaloids, polyphenols) or synthetic intermediates (Hardoim et al., 2015; Higginbotham et al. 2013, Khiralla et al., 2016) and are also able to influence the level of production of these metabolites in plants (Hardoim et al, 2015). The meta-organism formed by the plant and its endophytic microbial community can therefore be considered as a bioreactor producing a wide range of bioactive compounds and especially antimicrobial substances. This potential is so far largely unexplored (Bräder et al, 2014). **The general goal of the project is therefore to investigate this bioreactor to identify new antimicrobial compounds that can be valorized in the pharmaceutical and agrochemical sectors.** We assume that 1 / The taxonomic diversity of endophytic communities impacts the phytochemical profile and the bioactivity of plant extracts and 2 / that the endophytic microorganisms are a reservoir of new bioactive substances.

**The first part** of the work will aim to evaluate the relationships between the taxonomic composition of endophytic bacterial/fungal communities, phytochemical profiles and antimicrobial activity of plant extracts. Three different plants species of agricultural or pharmaceutical interest will be investigated: belonging to *Brassica*

*napus*, *B. rapa* (a Brassicaceae), *Leucojum* sp. and *Narcissus* sp. belonging to Amaryllidaceae, and *Ruta graveolens* a Rutaceae. These species, whose microbiota were never characterized, are known to synthesize antimicrobial metabolites belonging to different chemical families. To promote a modification of the endophytic microbiome profile, several genotypes will be grown on different types of soil and phytochemical profiles of plant extracts will be established by NMR metabolomic approaches (Deborde et al, 2017, Kim et al, 2010). The antimicrobial activities of the plant extracts will be assessed using *in vitro* bioassays targeting phytopathogenic agents (*Pythium* sp., *Rhizoctonia* sp., *Fusarium* sp., *Septoria* sp.) as well as human pathogens (ABC platform, SRSMC/L2CM). The taxonomic composition of endophytic communities will be analyzed by metagenomic methods (Luxembourg Institute of Science and Technology collaboration). Relationships between metabolic profiles, bio-activity of plant extracts and taxonomic diversity of endophytic communities will be established using multivariate analysis. These complementary approaches will allow selecting plants with contrasting metabolic profiles and antimicrobial activity, from which endophytic microorganisms will be isolated.

**The second part** of the work will be devoted to the taxonomic and functional characterization of isolates. Taxonomic characterization will be performed by sequencing 16S rDNA (bacteria) and 18S rDNA (fungi). The functional characterization will be carried out i) on microbial extracts using the aforementioned *in vitro* functional bio-assays and ii) using endophyte microorganism and target pathogen co-culture tests (Marmann et al., 2014). The metabolic profiles of the microbial extracts will be analyzed by NMR to identify the molecules with antimicrobial activities. These metabolic profiles will be related to the metabolic profiles of plants. This second part of the work will make it possible to select the most interesting microbial strains from a point of view of their metabolic abilities.

In a **third part** of the project, these strains will be inoculated under *in vitro* co-culture conditions on plant explants, to modify the synthesis of specialized metabolites by the host plant. The phytochemical profiles of the plant extracts will be established by NMR and the antimicrobial activities will be assessed using functional bioassays *in vitro*.

## Bibliographie/ Bibliography

- Berdy J. (2012). *Journal of Antibiotics* 1-11.
- Bräder G., Compant S., Mitter B., Trognitz F., Sessitsch A. (2014). *Current Opinion in Biotechnology* 27, 30-37.
- Brown E.D. (2006). *Nature* 441, 293-294.
- Bulgarelli D., Schlaeppi K., Spaepen S., Ver Loren van Themaat E., Schulze-Lefert P. (2013). *Annual Review of Plant Biology*. 64, 807-838.
- Bulgarelli D., Rott M., Schlaeppi K., van Themaat E.V.L., Ahmadinejad N., Assenza F., Rauf P., Huettel B., Reinhardt R., Schmelzer E., Peplies J., Gloeckner F.O., Amann R., Eickhorst T., Schulze-Lefert P. (2012). *Nature* 488, 91-95
- Deborde C., Moing A., Roch L., Jacob D., Rollin D., Giraudeau (2017). *Progress in Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy* 102–103, 61–97.
- Glare T., Caradus J., Gelernter W., Jackson T., Keyhani N., Köhl J., Marrone P., Morin L., Stewart A. (2012). *Trends in Biotechnology* 30, 250-258.
- Hardoim P.R., van Overbeek L.S., Berg G., Pirttilä A.M., Compant S., Campisano A., Döring M., Sessitsch A. (2015). *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. 79, 293-320.
- Higginbotham S.J., Arnold E., Ibanez A., Spadafora C., Coley P.D., Kursar T.A. (2013). *PLOS One* 8, e73192.
- Ishii H. (2006). *Japan Agricultural Research Quarterly* 40, 205-211.
- Khiralla A., Mohamed L.E., Tzanova T., Schohn E., Slezack-Deschaumes S., Hehn A., André P., Carre G., Spina R., Lobstein A., Yagi S., Laurain-Mattar D. (2016). *FEMS Microbiology Letters* 363,fnw089.
- Kim H.K., Choi Y.H., Verpoorte R. (2010). *Nature protocols*, 5, 536-549
- Lebeis S.L., Herrera Paredes S., Lundberg D.S., Breakfield N., Gehring J., McDonald M., Malfatti S., Glavina del Rio D., Jones C.D., Tringe S.G., Dangl J.L. (2015). *Science* aaa8764.
- McChesney J.D., Venkataraman S.K., Henri J.T. (2007). *Phytochemistry* 68, 2015-2022.
- Müller C.A., Obermeier M.M., Berg G. (2016). *Journal of Biotechnology* 235, 171-180.
- Novakova J., Farkasovsky M. (2013). *Biologia* 68, 1079-1086.
- Sumi C.D., Yang B.W., Yeo I-C., Young T.H. (2015). *Canadian Journal of Microbiology* 61, 93-103.
- Panke-Buisse K., Poole A.C., Goodrich J.K., Ley R.E., Kao-Kniffin J. (2015). *ISME Journal* 9, 980-989.