

Encadrement universitaire :  
**Damien Balestrino**

Recherche d'activités antimicrobiennes  
et herbicides chez des bactéries  
du microbiome de la truffe

28 mai – 3 août 2018

**Isabelle CANIHAC**

Stage encadré par :

**Aurélie Deveau**

Chargée de recherche, UMR 1136  
«Interactions Arbres-  
Microorganismes »,  
Centre INRA Grand-Est Nancy,  
Champenois

**Cyril Bontemps**

Maître de conférence, UMR 1128  
« Dynamique des Génomes et  
Adaptation Microbienne »,  
Université de Lorraine,  
Vandœuvre-lès-Nancy





# Sommaire

Remerciements

Liste des abréviations

Introduction .....1

Bibliographie.....2

**1. Matériels et méthodes.....4**

1.1. Culture des souches bactériennes ..... 4

1.2. Tests d'antibiose ..... 4

1.3. Tests de phytotoxicité sur *Arabidopsis thaliana* ..... 5

**2. Résultats .....6**

2.1. Diversité taxonomique des échantillons testés..... 6

2.2. Production de composés antimicrobiens ..... 6

2.3. Production de composés phytotoxiques ..... 7

**3. Discussion .....8**

3.1. Comparaison de la diversité taxonomique ..... 8

3.2. Production de composés antimicrobiens ..... 8

3.3. Production de composés phytotoxiques ..... 9

Conclusion générale et perspectives .....10

Références .....11

Index des illustrations

Index des Annexes

Résumé/Abstract



# Remerciements

Tout d'abord, je souhaite remercier l'Université Clermont-Auvergne (UCA) de nous permettre de réaliser un stage de minimum deux mois à la fin de notre Master 1, ainsi que Damien BALESTRINO pour ses conseils et son suivi au cours de mon stage.

Je souhaite également remercier Sébastien DUPLESSIS, Directeur de Recherche de l'unité « Écogénomique des Interactions » au sein de l'Unité Mixte de Recherche (UMR) 1136 « Interactions Arbres-Microorganismes » sur le Centre INRA Grand-Est de Nancy pour sa présentation générale de l'organisation de la structure du laboratoire ainsi que son intérêt pour mon travail.

Un grand merci tout particulier à mes deux tuteurs de stage Aurélie DEVEAU et Cyril BONTEMPS qui m'ont guidée dans le projet en m'accordant de leur temps, en répondant à mes questions et en me donnant des conseils avisés.

Je remercie également Stéphane UROZ et Claire FOURREY-VERNEAULT pour les discussions intéressantes que nous avons pu avoir, ainsi que Patrice VION pour les lancements d'autoclave sur les deux bâtiments.

D'autres personnes ont contribué au bon déroulement de mes activités et j'aimerais les remercier : Milena GONZALO KINZBRUNER pour sa bonne humeur et sa gentillesse, pour m'avoir montré certaines manipulations et m'avoir fait pratiquer mon anglais, Lauralie MANGEOT-PETER pour son accueil à l'arrêt de bus le premier jour et Liam LAURENT, un de mes collègues de bureau. Je remercie également Matthieu NICAULT d'avoir pris le temps de passer nos échantillons en Chromatographie en Phase Liquide à Haute Performance (HPLC) lors d'une expérience annexe.

Je salue et remercie toute l'équipe pour sa cohésion et sa bonne entente.



## Liste des abréviations

<i>A. thaliana</i>	<i>Arabidopsis thaliana</i>
<b>ADN</b>	acide désoxyribonucléique
<b>AIN</b>	nom de l'échantillon issu de la gleba (intérieur de la truffe)
<b>AOUT</b>	nom de l'échantillon issu du péridium (surface de la truffe)
<b>ARNr</b>	acide ribonucléique ribosomique
<b>AS</b>	« asco soil », sol adhérent à la surface de la truffe
<b>BS</b>	« bulk soil », sol nu situé dans le brûlé mais sans l'influence directe de la truffe
<b>DynAMic</b>	Dynamique des Génomes et Adaptation Microbienne
<b>HPLC</b>	Chromatographie en Phase Liquide à Haute Performance
<b>IAM</b>	Interactions Arbres-Microorganismes
<b>INRA</b>	Institut National de la Recherche Agronomique
<b>LabEX ARBRE</b>	Laboratoire d'Excellence de Recherches Avancées sur la Biologie de l'Arbre et les Écosystèmes Forestiers
<b>LB</b>	Luria Bertani (milieu)
<b>MS</b>	Murashige et Skoog (milieu)
<b>rpm</b>	rotations par minute
<b>SD</b>	Synthetic Defined (milieu)
<b>TSA</b>	Tryptic Soy Agar (milieu)
<b>TSB</b>	Tryptic Soy Broth (milieu)
<b>UCA</b>	Université Clermont-Auvergne
<b>UMR</b>	Unité Mixte de Recherche



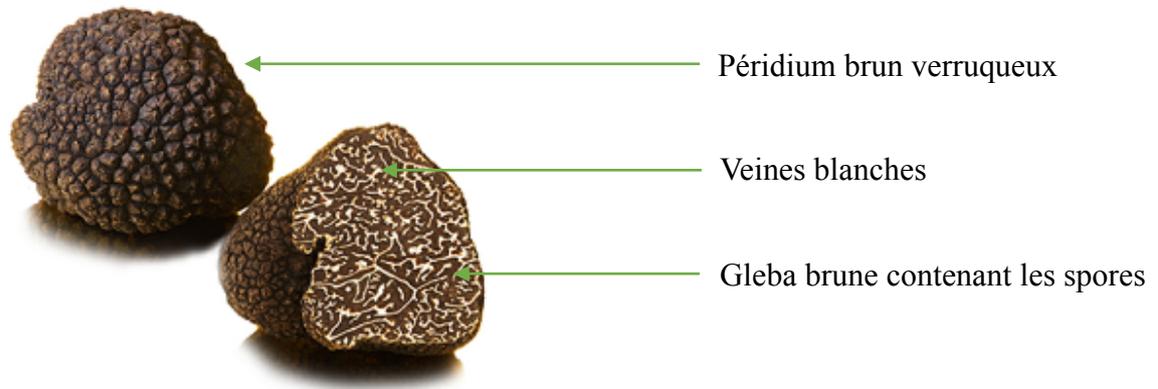
# Introduction

J'ai réalisé mon stage à l'interface entre deux unités de recherche, l'Unité Mixte de Recherche (UMR) 1136 « Interactions arbres/micro-organismes » (IAM) située sur le campus du Centre INRA Grand-Est Nancy, et l'UMR 1128 « Dynamique des Génomes et Adaptation Microbienne » (DynAMic) basée à l'Université de Lorraine sur le site de Vandoeuvre-lès-Nancy. Ces deux unités mixtes sont affiliées à la fois à l'Institut National de la Recherche Agronomique (INRA) et à l'Université de Lorraine. L'INRA est un organisme de recherche sur différentes thématiques, créé en 1946 et comportant 17 centres en France. Le Centre INRA Grand-Est Nancy regroupe 16 Unités de Recherche portant essentiellement sur deux axes : « Forêt-Bois-Territoire » et « Ingénierie et Sécurité des Aliments ». L'Université de Lorraine a créé le Laboratoire d'Excellence de Recherches Avancées sur la Biologie de l'Arbre et les Écosystèmes Forestiers (LabEx ARBRE), dont font partie les deux unités de recherche.

L'équipe « Écogénomique des Interactions » de l'UMR IAM cherche à comprendre la biologie et l'écologie des arbres associés à des micro-organismes dans les écosystèmes forestiers par des approches de génomique et de métagénomique, tandis que la thématique de recherche de l'unité DynAMic s'articule autour des mécanismes de transfert horizontal de gènes chez les bactéries.

Les pesticides chimiques sont aujourd'hui majoritairement utilisés dans les pratiques agricoles et leur toxicité environnementale suscite des inquiétudes. Une alternative envisageable serait des herbicides produits naturellement par des micro-organismes. Dans ce contexte, le projet BioTruf s'intéresse plus particulièrement aux brûlés des truffières, qui se caractérisent par la disparition de l'essentiel de la végétation aux pieds des arbres colonisés par des mycorhizes de truffes. Le mycélium de la truffe ne semble pas être entièrement responsable de cet effet allopathique et nous avons émis l'hypothèse que les bactéries associées aux truffes pourraient produire des composés herbicides impliqués dans la formation du brûlé. Une étude préliminaire a permis d'isoler des bactéries provenant du sol et de truffes, constituant une banque de 400 souches.

Les objectifs de ce stage sont donc de poursuivre l'étude préliminaire en criblant les souches bactériennes à la recherche de souches produisant des composés antimicrobiens ou herbicides puis d'identifier ces derniers.



**Figure 1 : Coupe d'ascocarpe de *Tuber melanosporum*.**

*Cette coupe d'ascocarpe de *Tuber melanosporum* montre un péridium noir brunâtre, une gleba brune contenant les spores ainsi que des veines blanches. (Provenance de l'image : <https://nouvo.com/>).*

# Bibliographie

Les truffes sont des eumycètes et plus précisément des ascomycètes appartenant au genre *Tuber*. Le mycélium issu de la germination des spores, va former une symbiose ectomycorhizienne par l'intermédiaire d'hyphes qui colonisent les racines de l'arbre hôte, principalement chêne et noisetier. Deux mycéliums compatibles réalisent ensuite une reproduction sexuée, ce qui va permettre à l'ascocarpe (corps fructifère comestible) de se développer sous terre. Celui-ci est composé d'une partie interne, la gleba, et d'une partie externe appelée périidium (Figure 1). Le développement de la truffe dure alors environ 6 à 8 mois, pendant lesquels les asques et les ascospores vont croître à l'intérieur de la gleba puis être libérées dans l'environnement afin d'induire un nouveau cycle biologique si la truffe n'est pas récoltée par les trufficulteurs. La truffe possède un microbiote avec des communautés différentes en fonction des tissus colonisés qui sont assimilables à différents habitats. En moyenne, elle possède  $10^6$  bactéries/gramme. La maturation de la truffe impacterait également la diversité des communautés bactériennes, notamment au niveau de la gleba et du périidium. Les Bactéroidètes diminuent dans la gleba au cours de la maturation et sont remplacés par des Alpha-protéobactéries, alors qu'ils augmentent significativement dans le périidium (Antony-Babu *et al.*, 2014). Chez *Tuber magnatum*, certaines Actinobactéries participeraient également à la nutrition de l'ascocarpe en solubilisant le phosphate de calcium, un nutriment difficilement accessible dans le sol (Pavić *et al.*, 2013).

Parmi les espèces commercialisées, on retrouve la truffe noire du Périgord (*Tuber melanosporum*), décrite la première fois en 1831 par Vittadini, ou encore la truffe blanche du Piémont (*Tuber magnatum*). La truffe est un produit avec une image de luxe, très prisée par les gastronomes, notamment grâce à son arôme. Cependant, un déclin de sa production est observé depuis plusieurs décennies. En 1868, la production française annuelle avoisinait les 1600 tonnes alors qu'aujourd'hui, elle est d'environ 30 tonnes. Cette dernière est essentiellement issue de truffières artificielles où de jeunes plants d'arbres préalablement mycorhizés à 100% avec le mycélium de truffe sont plantés puis cultivés. En 2011, le poids économique d'une récolte de truffes de 30 tonnes a été estimé à 100 millions d'euros annuels (Olivier *et al.*, 2012). Afin de contribuer au développement économique de cette filière, d'importants efforts de recherche ont été mis en place afin de comprendre les différents facteurs qui pourraient améliorer la compréhension du cycle de vie de la truffe ainsi que sa culture.

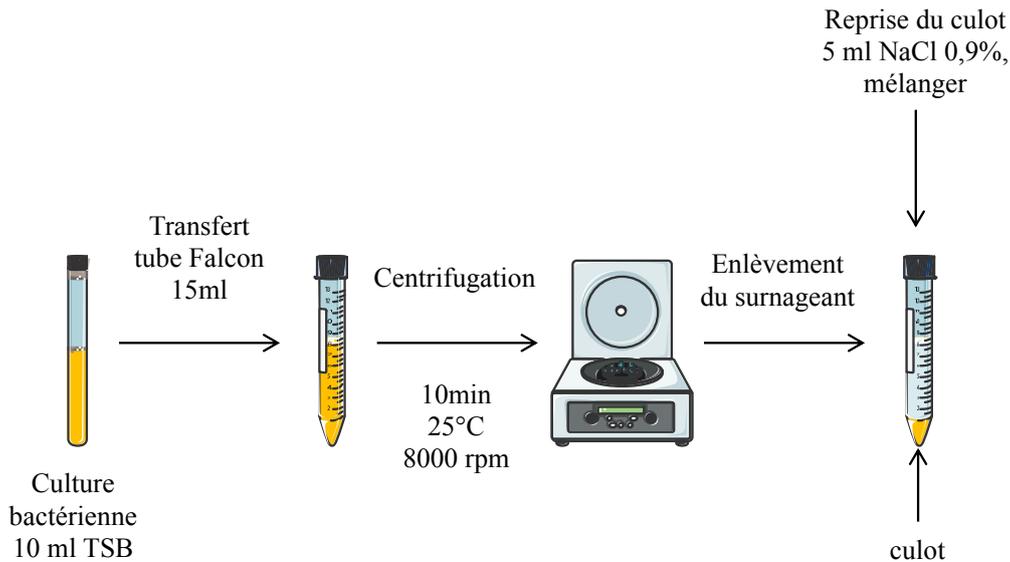


**Figure 2 : Photographie d'une zone de brûlé.**  
*Celle-ci se caractérise par la disparition de l'essentiel de la végétation au pied de l'arbre mycorhizé.*

Le projet BioTruf - auquel j'ai participé dans le cadre de ce stage - s'intéresse au microbiote de la truffe comme nouvelle source de biomolécules, en ciblant une zone peu étudiée appelée « brûlé », qui se caractérise par peu ou aucun développement de végétation autour du pied de l'arbre mycorhizé (Figure 2). Il est connu que le brûlé impacte à la fois les communautés bactériennes et la diversité fongique du sol: les *Firmicutes* sont plus représentés à l'intérieur du brûlé (Mello *et al.*, 2013) et *T. melanosporum* y deviendrait dominant (Napoli *et al.*, 2010). Au niveau des ectomycorhizes, où le mycélium forme un manchon qui entoure les racines puis pénètre entre les cellules racinaires (réseau de Hartig), un enrichissement en Alpha- et Gamma-protéobactéries a été retrouvé, en comparaison avec le « sol nu » qui n'est pas sous l'influence de la rhizosphère (Deveau *et al.*, 2016). De plus, les composés volatils participant aux qualités organoleptiques de la truffe pourraient être impliqués dans la formation du brûlé. En effet, une étude sur *Arabidopsis thaliana* a démontré que certaines molécules volatiles de la truffe avec huit carbones, tel le 1-octen-3-ol, induisaient un stress oxydatif et une inhibition racinaire. Dans certains cas, un blanchissement indiquant une phytotoxicité était également observé (Splivallo *et al.*, 2007).

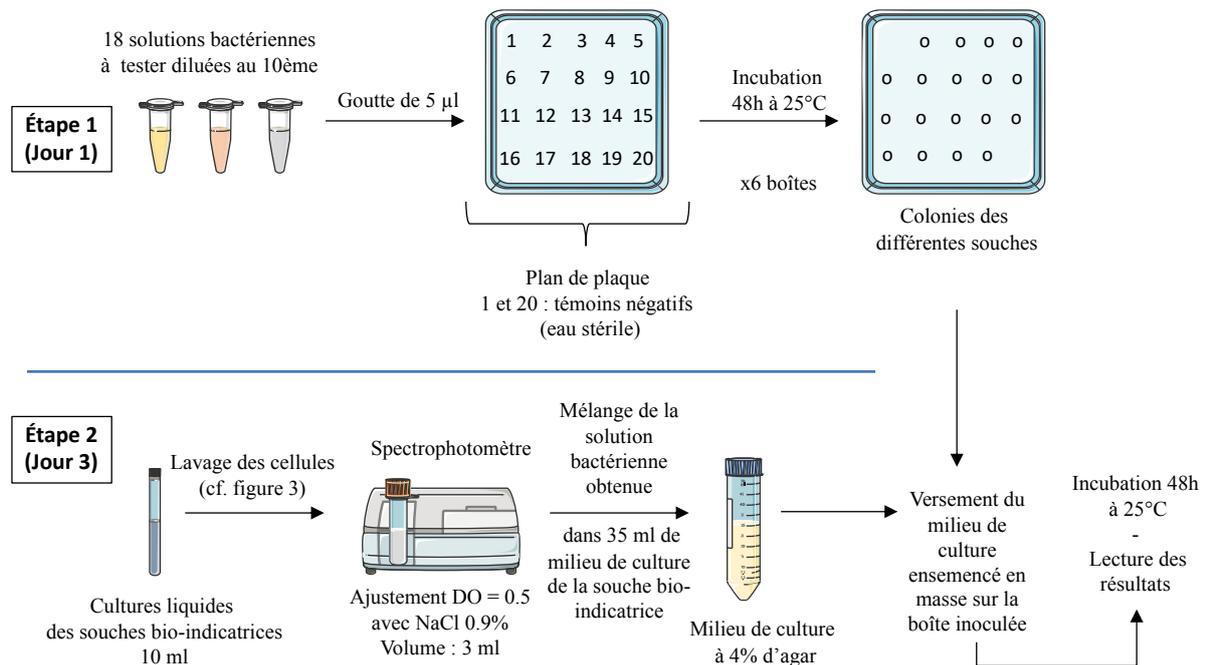
Après échantillonnage dans la truffière de Rollainville, une étude métagénomique a été réalisée sur l'ADN extrait des différents compartiments du sol et de la truffe (Antony-Babu *et al.*, 2014) et une collection de bactéries cultivables a été créée. L'identité d'une partie de ces bactéries a été obtenue par séquençage Sanger classique de la région 16S de l'ADN ribosomique. Des tests concernant la capacité de mobilisation des composés inorganiques et la dégradation de la matière organique ont également été réalisés. Dans le cadre du projet BioTruf, une approche cultivable à partir des souches de la collection a été choisie, afin de cribler visuellement celles produisant des composés antimicrobiens ou herbicides, et d'identifier ces derniers.

La stratégie utilisée pour tester les souches produisant des composés antimicrobiens est une version inversée de la technique de « soft agar overlay ». En effet, celle-ci présente plusieurs avantages majeurs: elle est peu chère, simple à mettre en œuvre, sa rapidité permet de cribler plusieurs souches sur une seule boîte et les résultats sont généralement faciles à interpréter. Afin de savoir si les bactéries contribuent à la formation de brûlés par la production de molécules herbicides, l'organisme modèle *Arabidopsis thaliana* a été utilisé. Cette plante a l'avantage de croître rapidement, tout en prenant peu de place puisqu'il est possible d'ensemencer environ 50 graines par boîte.



**Figure 3 : Schéma de l'étape de préparation des échantillons.**

La culture bactérienne de 10ml de milieu TSB a été transférée dans un tube Falcon de 15ml, puis centrifugée à 25°C pendant 10min à 8000 rpm. Le surnageant a été enlevé et le culot restant repris dans 5ml de NaCl 0.9%.



**Figure 4 : Schéma du déroulement du test d'antibiose.**

Les 18 solutions bactériennes à tester diluées au 10<sup>ème</sup> ont chacune été déposées en une goutte de 5 µl. Deux témoins négatifs d'une goutte de 5 µl d'eau stérile chacun ont été déposés aux emplacements 1 et 20. Six boîtes identiques ont été réalisées. Celles-ci étaient ensuite incubées pendant 48h à 25°C. Les cultures liquides des souches bio-indicatrices ont ensuite été ajustées à une densité optique (DO) de 0,5 dans un volume de 3 ml. Le milieu de culture à 4% d'agar spécifique à chaque souche bio-indicatrice a ensuite été ensemencé en masse avec chaque solution bactérienne préalablement obtenue, puis versé sur la boîte inoculée. Les six boîtes ont ensuite été incubées à nouveau pendant 48h à 25°C avant de rendre possible la lecture des résultats.

# 1. Matériels et méthodes

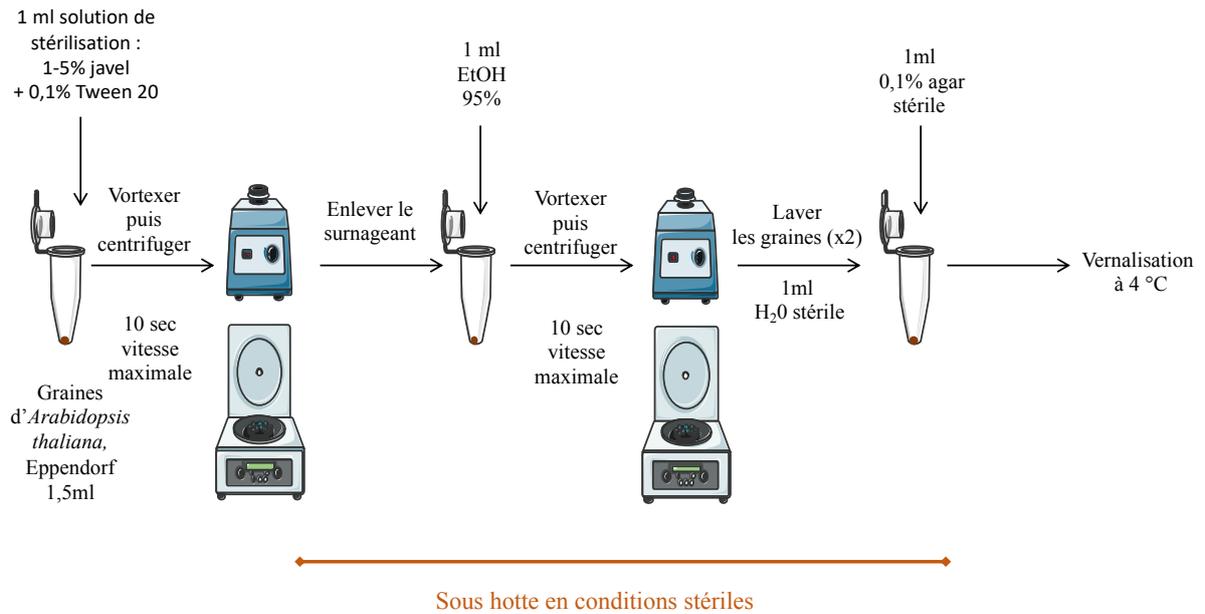
Les échantillons utilisés proviennent de la truffière artificielle de Rollainville, située dans les Vosges. La truffière, constituée de chênes et de noisetiers, a été inoculée avec *T. melanosporum* en 1991. Les échantillons utilisés dans ce rapport ont été récoltés sous des noisetiers en décembre 2010 (D5) et janvier 2011 (D6), qui correspondent à des stades de truffes matures. Quatre compartiments différents ont été échantillonnés : le sol adhérent à la surface de la truffe (AS), le sol nu (BS) situé dans le brûlé mais qui n'est pas sous l'influence directe de la truffe, le péridium (AOUT) et la gleba (AIN). A partir de ces échantillons (3-4 truffes par date), 158 souches pures ont pu être isolées et purifiées, certaines d'entre elles ont été identifiées par analyse des séquences du gène codant l'ARNr 16S. Toutes ces souches ont été conservées à -80°C dans du glycérol au laboratoire. Par ailleurs, la composition des différents milieux utilisés est décrite en Annexe 1 et pour chaque résultat, des photos ont été prises. Les tests statistiques ont été réalisés avec un outil en ligne (<http://www.socscistatistics.com>).

## 1.1. Culture des souches bactériennes

Les souches bactériennes ont été cultivées sur milieu solide Tryptic Soy Agar (TSA) à 10% en faisant un étalement « trois secteurs », puis incubées 48h à 25°C afin de vérifier leur pureté. Quelques colonies de chaque souche ont été ensuite prélevées pour être cultivées dans 10 ml de milieu liquide Tryptic Soy Broth (TSB) à 25°C pendant 48h sous agitation à 150 rotations par minute (rpm), afin d'assurer une oxygénation et une croissance bactérienne optimales. Les suspensions bactériennes ont été centrifugées à 8000 rpm pendant 10 min à 25°C puis lavées avec une solution de NaCl 0,9% comme montré dans la Figure 3. Une dilution au 10<sup>ème</sup> a ensuite été effectuée.

## 1.2. Tests d'antibiose

L'objectif de cette expérimentation était d'identifier des souches produisant des composés antimicrobiens contre six souches bio-indicatrices : *Staphylococcus* sp. D6 AIN 09, *Bacillus* sp. D6 BS 01, *Micrococcus luteus*, *Streptomyces olivochromogenes* A14, *Escherichia coli* E71, et *Saccharomyces cerevisiae* G117. Ces souches ont été sélectionnées pour leur intérêt écologique (interactions bactéries/bactéries dans l'écosystème truffier) ou biomédical (potentiellement pathogène). La Figure 4 présente un schéma de la manipulation complète.



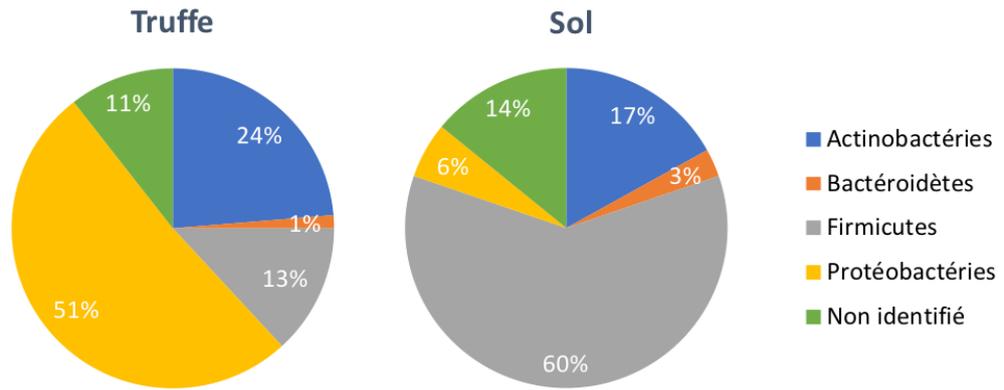
**Figure 5 : Schéma de stérilisation des graines d'*Arabidopsis thaliana*.**

Les graines d'*Arabidopsis thaliana* ont été placées dans un tube Eppendorf de 1,5 ml. Une solution de stérilisation a été ajoutée, puis le tube a été vortexé puis centrifugé pendant 10 sec à vitesse maximale. Le surnageant a été enlevé et 1 ml d'éthanol (EtOH) 95% a été rajouté en conditions stériles. Le tube a de nouveau été vortexé et centrifugé comme précédemment. Les graines ont ensuite été lavées deux fois avec 1ml d'eau stérile, avant d'ajouter 1 ml d'agar 0,1% stérile et de procéder à la vernalisation à 4°C.

En suivant un plan précis, une goutte de 5 µl de chacune des 18 solutions bactériennes à tester ainsi que 2 gouttes de 5 µl d'eau stérile (témoins négatifs) ont été déposées sur chacune des 6 boîtes carrées de milieu TSA 10% (une boîte par souche bio-indicatrice). Les boîtes étaient ensuite incubées à 25°C pendant 48h. Parallèlement, des cultures liquides des différentes souches bio-indicatrices ont été effectuées dans les milieux appropriés : *Streptococcus*, *Bacillus* et *Micrococcus* dans du TSB, *E. coli* dans du milieu Luria Bertani (LB) et *S. cerevisiae* dans du milieu Synthetic Defined (SD). Après centrifugation et lavage (voir Figure 3), les suspensions bactériennes ont été ajustées à une densité optique (DO) de 0,5 dans 3 ml de NaCl 0,9%. Cette solution bactérienne a étéensemencée en masse dans 35 ml de milieu gélosé adapté aux différentes souches bio-indicatrices à 4% d'agar avant d'être versée sur les boîtes carrées précédemment inoculées avec les souches à tester. Pour *Streptomyces A14*, 3 µl d'une solution contenant 10<sup>8</sup> spores a été utilisée. La DO finale dans chaque couche d'agar (une par souche bio-indicatrice) était de 0,05. Après 48h d'incubation, le résultat était considéré positif s'il y avait apparition d'un halo autour de la colonie à tester, signe que la souche bio-indicatrice ne s'était pas développée.

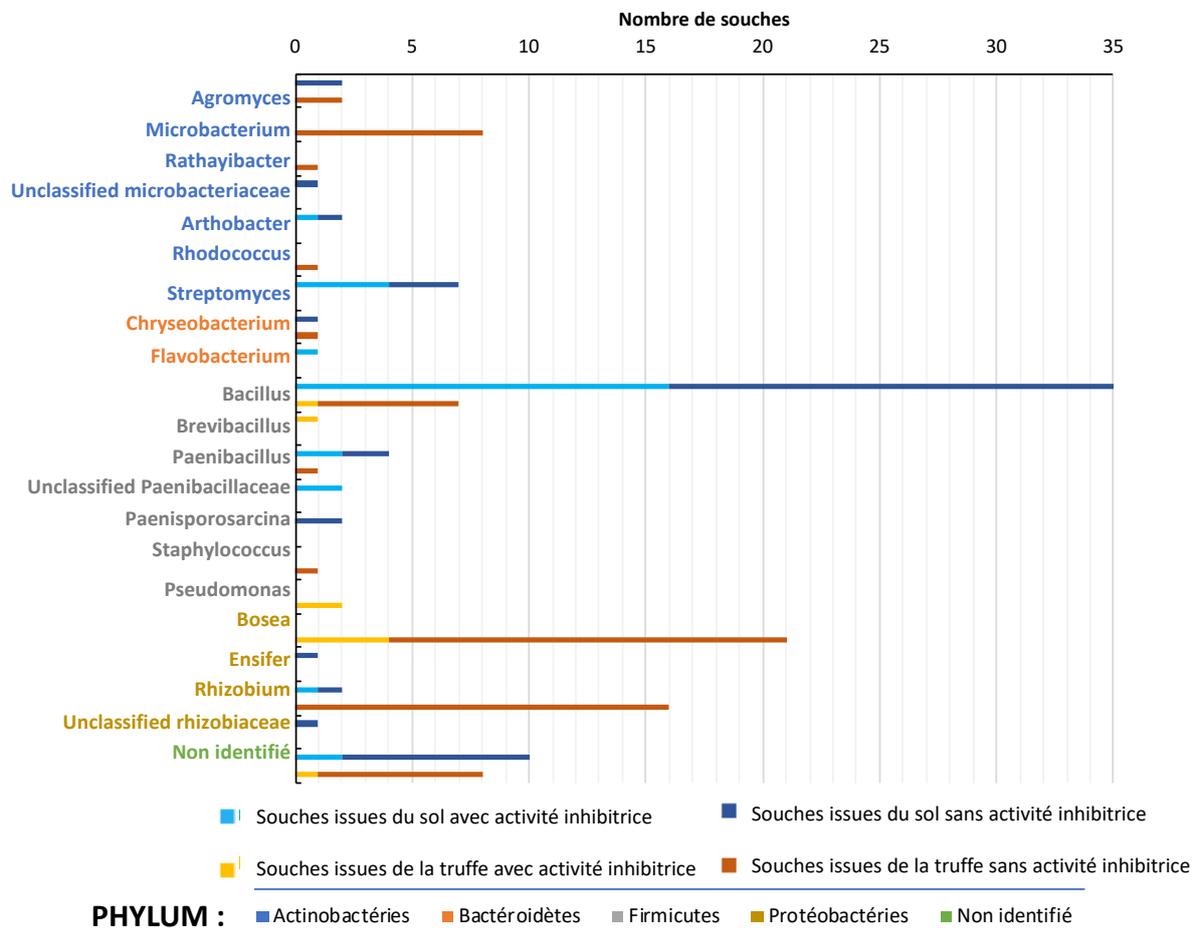
### **1.3. Tests de phytotoxicité sur *Arabidopsis thaliana***

L'objectif de cette expérimentation était d'identifier des souches produisant des composés herbicides contre *Arabidopsis thaliana*. Les graines de cette plante ont été stérilisées selon le protocole décrit dans la Figure 5, puis vernalisées (mises à 4°C pendant 48h dans l'obscurité pour stimuler la germination) avant d'avoir été déposées une à une sur un milieu de Murashige et Skoog (MS). Les boîtes ont été placées dans un phyto-incubateur à 24°C avec une photopériode de 16h. Après la germination des graines, les jeunes pousses ont été transférées sur un milieu MS-glucose sous hotte à flux laminaire, à raison de 3 plantes par boîte. La procédure de préparation des cultures bactériennes à tester était identique à celle utilisée dans le test d'antibiose. Une goutte de 5 µl de chaque solution bactérienne a ensuite été déposée à 1 cm du bout de la racine. L'idée étant de faire un criblage semi-haut débit, chaque souche était testée une seule fois. Le témoin négatif consistait à mettre la plante seule. L'effet est dit herbicide si une nécrose de la racine et un arrêt de la croissance étaient observés, phytotoxique si la plante ne se développait pas correctement et phytobénéfique si celle-ci se développait davantage, en comparaison avec les plantes témoins. Afin d'essayer de limiter la variabilité des plantes utilisées, un effet positif ou négatif a été retenu lorsque la plante avait une densité racinaire supérieure ou inférieure à 50% par rapport aux témoins. Entre ces deux seuils, aucun effet sur la densité racinaire n'a été considéré.



**Figure 6 : Diversité taxonomique par phyla des souches bactériennes étudiées.**

Les 147 souches ont été regroupées par temps (D5 + D6) et par sous-compartiments (respectivement AOUT + AIN pour la truffe, AS + BS pour le sol)



**Figure 7 : Nombre de souches produisant des antibiotiques en fonction de leurs compartiments d'origine et de leurs identités taxonomiques.**

Cette figure montre le résultat du test d'antibiose (activité inhibitrice ou non) effectué sur les 147 souches testées, regroupées par phyla et par genre pour le compartiment du sol et de la truffe.

## 2. Résultats

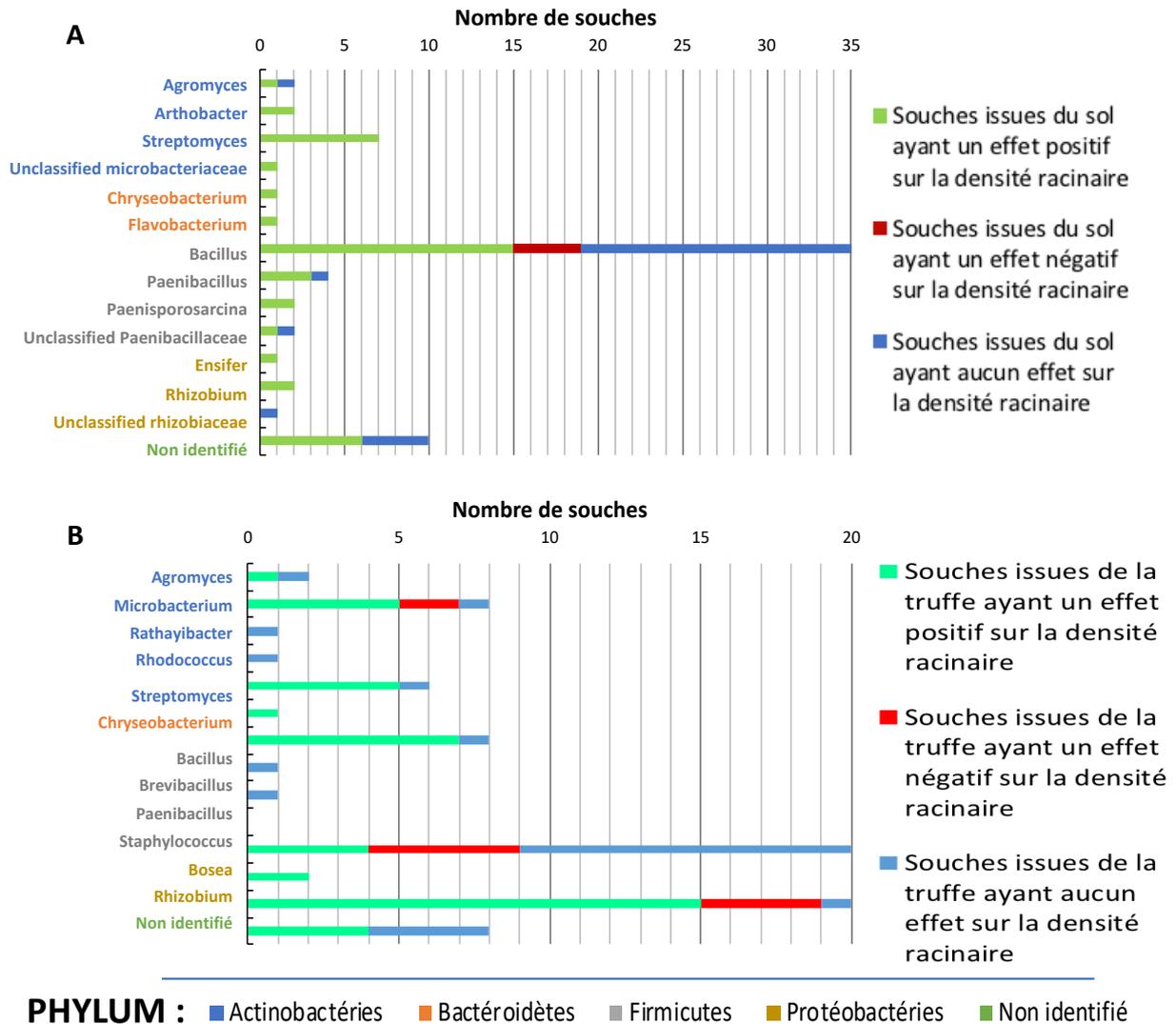
La production de composés antimicrobiens ou herbicides a été testée sur 147 souches provenant des quatre compartiments (AS, BS, AOUI et AIN) à deux temps d'échantillonnages différents (D5 et D6). Afin d'avoir un effectif suffisamment élevé pour pouvoir faire des tests statistiques, les données ont été regroupées au niveau temporel (D5 + D6) puis rassemblées en deux catégories : le sol (AS + BS) et la truffe (AOUI + AIN). Cependant, en raison de l'absence de réplicat sur les souches testées, ces résultats ne donnent qu'une tendance générale et devront être confirmés par d'autres expérimentations. L'Annexe 2 montre quelques photos de résultats obtenus pour les deux tests effectués.

### 2.1. Diversité taxonomique des échantillons testés

La Figure 6 montre un diagramme représentant la diversité taxonomique par phyla des 147 souches bactériennes isolées de la truffe (AS + BS) ou du sol (AOUI + AIN), indépendamment du temps d'échantillonnage (D5 + D6). Ces souches se regroupent en cinq phyla différents dont un « Non identifié », et 20 genres différents : les Actinobactéries (7 genres), les Bactéroidètes (2 genres), les *Firmicutes* (7 genres) et les Protéobactéries (4 genres). Le phylum majoritaire dans la truffe est représenté par les Protéobactéries (51%), tandis que dans le sol ce sont les *Firmicutes* (60%). Les Bactéroidètes sont peu représentés à la fois dans la truffe et dans le sol (respectivement 1% et 3%).

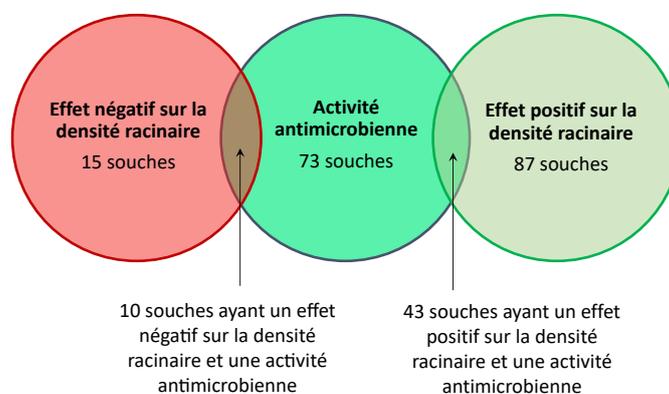
### 2.2. Production de composés antimicrobiens

L'activité des 147 souches a été testée par des tests d'antibiose sur six souches bio-indicatrices et 28% ont présenté une activité antimicrobienne. Sur l'ensemble des souches testées, 13% étaient actives contre une souche bio-indicatrice, 10% contre deux souches bio-indicatrices, 3% contre trois souches bio-indicatrices et 2% contre quatre souches bio-indicatrices. Aucune souche testée n'était active contre cinq ou six souches bio-indicatrices. Les trois souches bio-indicatrices les plus fréquemment inhibées étaient *Bacillus* sp. D6BS01 (sensible à 23 souches), *Staphylococcus* sp. D6AIN9 et *Micrococcus luteus* (chacune sensible à 19 souches). *Streptomyces olivochromogenes* A14 a été inhibé par 9 des souches testées. Les deux souches bio-indicatrices les moins fréquemment inhibées par les souches testées étaient la levure *S. cerevisiae* (2 souches testées) et *E. coli* qui n'a été inhibée par aucune des souches testées.



**Figure 8 : Résultats des tests de phytotoxicité sur *Arabidopsis thaliana*.**

Ces deux histogrammes empilés montrent les souches regroupées par phyla et par genre ayant un effet positif, négatif ou aucun sur la densité racinaire d' *Arabidopsis thaliana* pour les compartiments du sol (A) et de la truffe (B).



**Figure 9 : Diagramme d'Euler regroupant les résultats des tests d'antibiose et des tests de phytotoxicité.**

La production de composés antimicrobiens dépend du compartiment considéré : elle est significativement plus élevée chez les souches issues du sol que de la truffe ( $p < 0,05$  ; test d'indépendance du  $\chi^2$  ). La Figure 7 montre un histogramme empilé représentant l'activité inhibitrice ou non des souches provenant du sol ou de la truffe. Les bactéries issues de la truffe montrent une activité inhibitrice pour les phyla des Bactéroidètes, des *Firmicutes*, des Protéobactéries et « Non identifié ». Il n'y a pas d'activité inhibitrice au sein des Actinobactéries contrairement aux bactéries issues du sol qui présentent des activités inhibitrices pour tous les phyla. Parmi les souches issues du sol, les genres ayant le plus fort potentiel d'antibiose sont *Bacillus* (46% de souches actives sur les 35 souches du genre) et *Streptomyces* (56% de souche actives sur les 7 souches du genre). Chez les souches issues de la truffe, ce sont les genres *Bosea* (19% de souches actives sur les 21 souches du genre) et *Pseudomonas* (100% de souches actives sur les 2 souches du genre) qui ont le plus fort potentiel d'antibiose. Le genre *Rhizobium* est le second genre majoritaire chez les souches issues du sol (16 souches) mais aucune ne présente d'activité inhibitrice contre les souches bio-indicatrices.

### 2.3. Production de composés phytotoxiques

Sur l'ensemble des 147 souches testées, aucune n'a montré d'activité herbicide sur *Arabidopsis thaliana* mais 10% des souches testées ont inhibé la croissance racinaire de la plante, tandis que 60% des souches testées semblaient avoir eu un effet positif sur la densité racinaire. Pour les deux compartiments truffe et sol représentés Figure 8, tous les phyla contiennent des souches ayant un effet positif sur la densité racinaire. Nous n'avons pas pu distinguer d'effet significatif sur la densité racinaire quand on compare l'origine des souches (sol ou truffe) : en effet le test d'indépendance du  $\chi^2$  n'était pas significatif ( $p > 0,05$ ) concernant l'effet positif et l'effectif des souches ayant un effet négatif était trop faible pour être testé. Les souches issues du sol ayant un effet négatif sur la densité racinaire ne sont représentées que dans le genre *Bacillus* tandis que pour les souches issues de la truffe cet effet est observé pour les trois genres suivants : *Microbacterium*, *Bosea* et *Rhizobium*. Chez les souches issues du sol et de la truffe, l'effet positif sur la densité racinaire est représenté par tous les genres, sauf chez les *Unclassified rhizobiaceae* pour les souches issues du sol et les *Rathayibacter*, *Rhodococcus*, *Brevibacillus* et *Paenibacillus* pour les souches issues de la truffe. Il est intéressant de noter que 10 souches produisent à la fois des composés antimicrobiens et des composés phytotoxiques, tandis que 43 souches produisent à la fois des composés antimicrobiens et des composés phytobénéfiques (Figure 9).



## 3. Discussion

### 3.1. Comparaison de la diversité taxonomique

L'identification taxonomique des souches indique une nette différence dans la composition des communautés cultivables issues du sol et des truffes (comme précédemment décrit ; *Barbieri et al.*, 2005; *Sbrana et al.*, 2002). Par contre, les souches isolées sont partiellement représentatives de la diversité attendue d'après l'analyse métagénomique réalisée sur les mêmes échantillons. Le phylum majoritaire retrouvé dans le sol lors de l'analyse métagénomique réalisée en parallèle de la constitution de la collection de souches, appartient aux Bactéroidètes. En comparaison avec l'approche cultivable, ce phylum était peu représenté et le phylum majoritaire obtenu pour les souches issues du sol était les *Firmicutes*. Pour les souches isolées de la truffe, le phylum majoritaire retrouvé appartient aux Protéobactéries et plus particulièrement aux Alpha-protéobactéries (genres *Rhizobium* et *Bosea*), ce qui est retrouvé dans l'analyse métagénomique. Les genres les plus présents retrouvés lors de l'analyse métagénomique pour le compartiment du sol (*Terrimonas*, *Microscilla* et *Flavobacterium*) ne sont pas retrouvés lors de l'approche cultivable, à l'exception de *Flavobacterium*. Les genres les plus représentés pour la truffe lors de l'analyse métagénomique sont *Variovax*, *Pedobacter*, *Bradyrhizobium* et *Sphingobacterium* dont aucun n'a été retrouvé dans l'approche cultivable. Cependant, il est à noter que les régions séquencées entre l'approche cultivable et l'approche métagénomique ne sont pas les mêmes, *Bradyrhizobium* et *Bosea* étant très proches phylogénétiquement, il est possible d'avoir une confusion entre ces deux genres. Une autre possibilité est qu'elles ne soient pas cultivables sur le milieu utilisé ou qu'elles appartiennent aux souches encore non identifiées.

### 3.2. Production de composés antimicrobiens

Les tests réalisés suggèrent que la proportion de souches capables de produire des composés antimicrobiens serait significativement plus élevée ( $p < 0,05$ , test d'indépendance du  $\chi^2$ ) dans le sol que dans la truffe. La truffe contiendrait donc peu de souches capables de produire des composés antimicrobiens et la question de cette sélection reste ouverte. La production de composés antimicrobiens par les bactéries du sol pourrait être due à la présence de la truffe dans le sol, car il existe de fortes interactions entre les mycètes et les bactéries (*Bahram et al.*, 2018). Une autre hypothèse serait que les composés antimicrobiens soient néfastes pour la truffe.



Les souches issues du sol ayant le plus fort potentiel d'antibiose étaient *Bacillus* et *Streptomyces*. Ceci est en accord avec la littérature. En effet, ces genres bactériens sont reconnus comme étant d'importants producteurs de composés microbiens et sont utilisés pour des applications biotechnologiques. Le genre *Bacillus* pourrait être une source de nouveaux antibiotiques par la production de peptides antimicrobiens (Sumi *et al.*, 2015), tandis le genre *Streptomyces* est connu pour sa production de composés antimicrobiens.

### **3.3. Production de composés phytotoxiques**

L'hypothèse de départ, à savoir que les bactéries isolées du sol et de la truffe produisaient des composés herbicides, n'a pas été confirmée car aucun effet de ce type n'a été observé sur les souches testées en présence de *Arabidopsis thaliana*. Soit les bactéries ne sont pas responsables de la formation du brûlé, soit nous n'avons pas isolé les bactéries actives, soit les bactéries agissent en consortia. Cependant, des effets phytotoxiques et phytobénéfiques ont été remarqués. L'effet phytotoxique pour les souches issues du sol a été exclusivement observé pour des souches appartenant au genre *Bacillus*. Certaines espèces de ce genre auraient la capacité d'inhiber certaines bactéries et de promouvoir la formation de racines en produisant des composés volatils (Rath, Mitchell, et Gold, 2018). L'effet phytotoxique pour les souches issues de la truffe a été observé pour les trois genres suivants : *Microbacterium*, *Bosea* et *Rhizobium*. Cependant les Rhizobiacées auxquels appartiennent *Bosea* et *Rhizobium* sont plutôt connues pour avoir un effet « PGP » (Plant Growth-Promoting) car elles colonisent les racines des plantes. Il est donc surprenant de les retrouver associées à un effet négatif, ce qui demanderait de répéter l'expérimentation afin de confirmer ce résultat.

L'objectif étant de faire du criblage semi-haut débit sur un phénotype qui devait être visuellement remarquable (mort de la plante), la méthode d'analyse des résultats a dû être adaptée afin d'avoir des résultats semi-quantitatifs exploitables. Le seuil de 50% d'effet positif ou négatif a été arbitrairement défini dans l'optique de limiter la variabilité intrinsèque de la croissance de la plante, car seulement un seul réplicat par souche testée a été réalisé. De plus, le stade de croissance de la plante semble avoir également un effet sur le potentiel d'inhibition des bactéries. De plus, il n'est pas impossible d'avoir eu des effets d'influence entre les bactéries si les composés produits étaient volatils ou solubles puisque trois souches de bactéries différentes étaient inoculées dans la même boîte. Ces résultats sont donc très préliminaires et des expériences additionnelles seront nécessaires pour pouvoir définitivement conclure.



## Conclusion générale et perspectives

Les pesticides chimiques sont aujourd'hui majoritairement utilisés dans les pratiques agricoles et leur toxicité environnementale suscite des inquiétudes. Dans ce contexte, le projet BioTruf s'intéresse plus particulièrement aux brûlés des truffières, qui se caractérisent par la disparition de l'essentiel de la végétation aux pieds des arbres colonisés par des mycorhizes de truffes et qui pourraient être à l'origine d'herbicides produits naturellement par des micro-organismes. Les objectifs de ce stage étaient de faire un criblage semi-haut débit de souches bactériennes cultivables issues du sol et de la truffe à la recherche de souches produisant des composés antimicrobiens ou herbicides, puis de les identifier.

Au total, 147 souches bactériennes ont été criblées. Leur composition taxonomique se répartissait en cinq phyla distincts dont un « Non identifié », avec un total de 20 genres différents : les Actinobactéries (7 genres), les Bactéroidètes (2 genres), les *Firmicutes* (7 genres) et les Protéobactéries (4 genres).

Le criblage des souches produisant des composés antimicrobiens a été réalisé selon une technique inversée de « soft agar overlay », avec six souches bio-indicatrices. La production de composés antimicrobiens semble également être plus importante chez les souches issues du sol (genres *Bacillus* et *Streptomyces*) que dans la truffe (genres *Bosea* et *Pseudomonas*) après un test d'indépendance du  $\chi^2$  au seuil de 0,05.

L'effet herbicide des souches bactériennes a été testé sur *Arabidopsis thaliana*. Aucun effet herbicide n'a été constaté, en revanche un effet sur la densité racinaire a été observé : 10% des souches testées ont eu un effet phytotoxique (uniquement genre *Bacillus*) et 60% des souches testées ont eu un effet phytobénéfique (genre *Microbacterium*, *Bosea* et *Rhizobium*). La production de molécules phytobénéfiques ne semble pas dépendre d'un compartiment donné (test d'indépendance du  $\chi^2$ , seuil 5%) et l'effet négatif n'a pas pu être testé (effectif trop faible).

Une tendance générale concernant la production de molécules d'intérêt par le microbiote de la truffe semble se dégager. Les perspectives sont nombreuses pour la suite du projet BioTruf : tests des souches en réplicat, tests des souches en combinaison, tests avec d'autres souches bio-indicatrices ou espèces végétales, ainsi que l'identification des composés actifs.



# Références

- Antony-Babu, S., Deveau, A., Van Nostrand, J. D., Zhou, J., Le Tacon, F., Robin, C., ... Uroz, S. (2014). Black truffle - associated bacterial communities during the development and maturation of *Tuber melanosporum* ascocarps and putative functional roles: *Tuber melanosporum* -associated bacterial communities. *Environmental Microbiology*, 16(9), 2831-2847. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.12294>
- Bahram, M., Hildebrand, F., Forslund, S. K., Anderson, J. L., Soudzilovskaia, N. A., Bodegom, P. M., ... Bork, P. (2018). Structure and function of the global topsoil microbiome. *Nature*. <https://doi.org/10.1038/s41586-018-0386-6>
- Barbieri, E., Bertini, L., Rossi, I., Ceccaroli, P., Saltarelli, R., Guidi, C., ... Stocchi, V. (2005). New evidence for bacterial diversity in the ascoma of the ectomycorrhizal fungus *Tuber borchii* Vittad. *FEMS Microbiology Letters*, 247(1), 23-35. <https://doi.org/10.1016/j.femsle.2005.04.027>
- Deveau, A., Antony-Babu, S., Le Tacon, F., Robin, C., Frey-Klett, P., & Uroz, S. (2016). Temporal changes of bacterial communities in the *Tuber melanosporum* ectomycorrhizosphere during ascocarp development. *Mycorrhiza*, 26(5), 389-399. <https://doi.org/10.1007/s00572-015-0679-7>
- Jean-Marc Olivier, Jean-Charles Savignac, & Pierre Sourzat. (2012). *Truffe et Trufficulture* (2<sup>e</sup> éd.). Périgueux: Fanlac.
- Mello, A., Ding, G.-C., Piceno, Y. M., Napoli, C., Tom, L. M., DeSantis, T. Z., ... Bonfante, P. (2013). Truffle Brûlés Have an Impact on the Diversity of Soil Bacterial Communities. *PLoS ONE*, 8(4), e61945. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0061945>
- Napoli, C., Mello, A., Borra, A., Vizzini, A., Sourzat, P., & Bonfante, P. (2010). *Tuber melanosporum*, when dominant, affects fungal dynamics in truffle grounds. *New Phytologist*, 185(1), 237-247. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2009.03053.x>
- Pavić, A., Stanković, S., Saljnikov, E., Krüger, D., Buscot, F., Tarkka, M., & Marjanović, Ž. (2013). Actinobacteria may influence white truffle (*Tuber magnatum* Pico) nutrition, ascocarp degradation and interactions with other soil fungi. *Fungal Ecology*, 6(6), 527-538. <https://doi.org/10.1016/j.funeco.2013.05.006>
- Rath, M., Mitchell, T. R., & Gold, S. E. (2018). Volatiles produced by *Bacillus mojavensis* RRC101 act as plant growth modulators and are strongly culture-dependent. *Microbiological Research*, 208, 76-84. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2017.12.014>
- Sbrana, C., Agnolucci, M., Bedini, S., Lepera, A., Toffanin, A., Giovannetti, M., & Nuti, M. P. (2002). Diversity of culturable bacterial populations associated to *Tuber borchii* ectomycorrhizas and their activity on *T. borchii* mycelial growth. *FEMS Microbiology Letters*, 211(2), 195-201. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2002.tb11224.x>
- Splivallo, R., Novero, M., Berteà, C. M., Bossi, S., & Bonfante, P. (2007). Truffle volatiles inhibit growth and induce an oxidative burst in *Arabidopsis thaliana*. *New Phytologist*, 175(3), 417-424. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2007.02141.x>
- Sumi, C. D., Yang, B. W., Yeo, I.-C., & Hahm, Y. T. (2015). Antimicrobial peptides of the genus *Bacillus*: a new era for antibiotics. *Canadian Journal of Microbiology*, 61(2), 93-103. <https://doi.org/10.1139/cjm-2014-061>



# Index des illustrations

**Figure 1 :** Coupe d'ascocarpe de *Tuber melanosporum*.

**Figure 2 :** Photographie d'une zone de brûlé.

**Figure 3 :** Schéma de l'étape de préparation des échantillons.

**Figure 4 :** Schéma du déroulement du test d'antibiose.

**Figure 5 :** Schéma de stérilisation des graines d'*Arabidopsis thaliana*.

**Figure 6 :** Diversité taxonomique par phyla des souches bactériennes étudiées.

**Figure 7 :** Nombre de souches produisant des antibiotiques en fonction de leurs compartiments d'origine et de leurs identités taxonomiques.

**Figure 8 :** Résultats des tests de phytotoxicité sur *Arabidopsis thaliana*.

**Figure 9 :** Diagramme d'Euler regroupant les résultats des tests d'antibiose et des tests de phytotoxicité.



# **Index des Annexes**

**Annexe 1** : Composition des milieux utilisés..... I

**Annexe 2** : Photos de quelques résultats pour le test d'antibiose et de phytotoxicité ..... II



## Annexe 1 : Composition des milieux utilisés

La composition des milieux suivante est pour 1L d'eau distillée :

**Milieu Tryptic Soy Agar  
à 10% (TSA) - Tryptic  
Soy Broth (TSB) si pas  
d'agar**

Tryptic Soy Broth	3 g
Agar	15 g

**Milieu Synthetic Defined  
(SD)**

Glucose	20 g
Peptone	10 g
Agar	15 g

**Milieu Luria Bertani  
(LB)**

Tryptone	10 g
Yeast Extract	5 g
NaCl	10 g

**Milieu de Murashige et Skoog (MS)**

<i>Macroelements</i>	50 ml
<i>Microelements</i>	100 ml
Sucrose	1g
MES	1g

Ajuster le pH à 5.8, puis ajouter 10g d'agar-agar avant d'autoclaver.

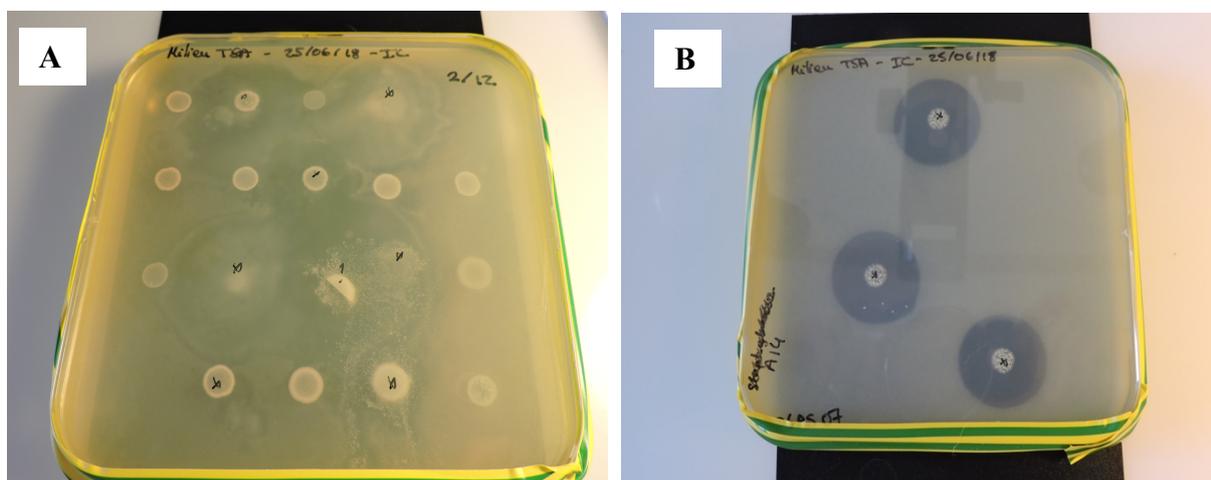
Vitamin 100X Stock solution (ajouter après autoclavage)	10ml
<i>Gamborgs Vitamines</i> (ajouter après autoclavage)	1 ml

Vitamine Suppl. 100X – pour 100ml : Préparer dans de l'eau ultra pure, filtrer stérilement puis aliquoter à 10ml ; garder à 4°C

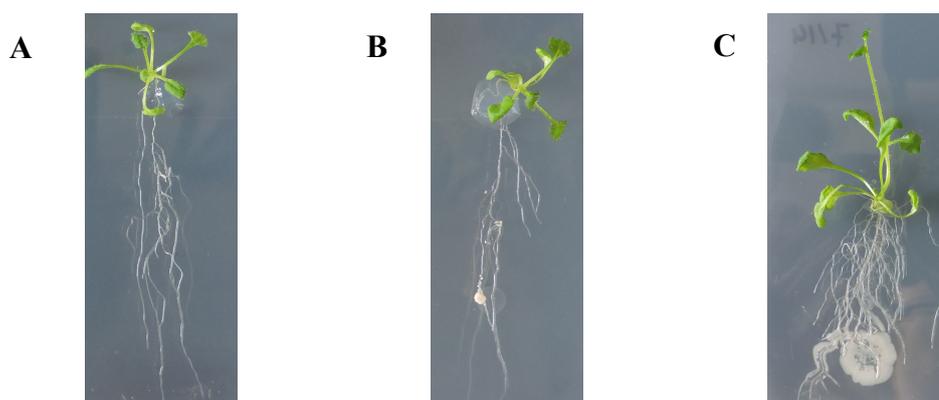
L-Glutamine	2 g
Ca-Panthotenate	0,01 g
L-Cystéine chlorhydrate	0,01 g
Biotine	1ml de sol stock à 0,1 mg/mL



## Annexe 2 : Photos de quelques résultats pour le test d'antibiose et de phytotoxicité



**Photographie du résultat d'un test d'antibiose.** En **A**, test de 18 souches contre la souche bio-indicatrice *Bacillus* sp. D6BS01. Six souches montrent des résultats positifs (halo d'inhibition). En **B**, test de la souche D6BS07 contre la souche bio-indicatrice *Streptomyces olivochromogenes* A14, sur une boîte à part suite à un résultat non-interprétable. Un halo d'inhibition très marqué est observé, la souche a donc une activité antimicrobienne.



**Photographie d'un test de phytotoxicité sur *Arabidopsis thaliana*.** En **A**, plante témoin. En présence de souches testées : observation en **B** d'un effet phytotoxique sur la densité racinaire, et en **C** d'un effet phytobénéfique sur la densité racinaire.



## Résumé

Le développement de *Tuber melanosporum* est associé à une zone appelée « brûlé », caractérisée par la disparition de l'essentiel de la végétation aux pieds des arbres hôtes. Le projet BioTruf cherche de nouvelles molécules antimicrobiennes et herbicides produites par des micro-organismes, ce qui permettrait de limiter l'utilisation de produits chimiques. Des tests d'antibiose avec la méthode « soft agar overlay » et des tests de phytotoxicité sur *Arabidopsis thaliana* avec six souches bio-indicatrices ont été réalisés sur 147 souches provenant du sol et de la truffe dans un objectif de criblage semi-haut débit. La diversité retrouvée par l'approche cultivable (5 phyla, 20 genres) montre une différence entre la truffe et le sol, retrouvée dans la littérature. La production de composés antimicrobiens semble être plus importante chez les souches issues du sol (genres *Bacillus* et *Streptomyces*, producteurs de composés antimicrobiens selon la littérature) que dans la truffe (genres *Bosea* et *Pseudomonas*). Aucun effet herbicide n'a été constaté sur *Arabidopsis thaliana*, mais un effet sur la densité racinaire a été observé : 10% des souches testées ont eu un effet phytotoxique et 60% ont eu un effet phytobénéfique. Ces résultats sont préliminaires et des expériences additionnelles seront nécessaires pour conclure définitivement.

**Mots-clés :** truffe, bactéries, antibiose, phytotoxicité, *Arabidopsis thaliana*.

## Abstract

The *Tuber melanosporum* development is associated with the production of an area without vegetation (referred to the French word “brûlé”) around the symbiotic plant. The BioTruf project is looking for new antimicrobial and herbicide compounds naturally produced by micro-organisms, which could limit the use of chemicals products. Antibiosis tests with the “soft agar overlay” method with six bio-indicators strains and phytotoxicity tests on *Arabidopsis thaliana* were performed on 147 bacteria from soil and truffles to a semi-high screening. Diversity by cultural approach (5 phyla, 20 genres) showed a difference between soil and truffle, as found in literature. The antimicrobial production seems to be more important by strains from soil (genus *Bacillus* and *Streptomyces*, producers of antibiotic compounds according to literature) rather than strains from truffles (genus *Bosea* and *Pseudomonas*). No herbicide effect has been observed on *Arabidopsis thaliana*, but an effect on the root density has been showed : 10% of tested strains had a phytotoxic effect and 60% a phytobeneficial effect. These results are very preliminary and additional experiments will be necessary to confirm definitively.

**Key-words :** truffle, bacteria, antibiosis, phytotoxicity, *Arabidopsis thaliana*.