



Compte-rendu de fin de projet

Projet ANR-17-CE20-0030-02

SREPTOCONTROL

AAP GÉNÉRIQUE 2017 »

A	IDENTIFICATION.....	2
B	RESUME CONSOLIDE PUBLIC	2
B.1	Instructions pour les résumés consolidés publics	2
B.2	Résumé consolidé public en français	3
B.3	Résumé consolidé public en anglais.....	5
C	MEMOIRE SCIENTIFIQUE.....	6
C.1	Résumé du mémoire	7
C.2	Enjeux et problématique, état de l'art	8
C.3	Approche scientifique et technique.....	10
C.4	Résultats obtenus	11
C.5	Exploitation des résultats.....	13
C.6	Discussion	13
C.7	Conclusions.....	13
C.8	Références.....	13
D	LISTE DES LIVRABLES.....	13
E	IMPACT DU PROJET	14
E.1	Indicateurs d'impact	14
E.2	Liste des publications et communications.....	15
E.3	Liste des éléments de valorisation.....	16
E.4	Bilan et suivi des personnels recrutés en CDD (hors stagiaires)	17

Ce document est à remplir par le coordinateur en collaboration avec les partenaires du projet. L'ensemble des partenaires doit avoir une copie de la version transmise à l'ANR.

Ce modèle doit être utilisé uniquement pour le compte-rendu de fin de projet.

A IDENTIFICATION

Acronyme du projet	STREPTOCONTROL
Titre du projet	Identification, mode of action and synthesis of defense elicitors and antifungal compounds from a bacterial strain used in plant protection
Coordinateur du projet (société/organisme)	Bernard DUMAS
Période du projet (date de début – date de fin)	01/03/2018 – 31/08/2022
Site web du projet, le cas échéant	

Rédacteur de ce rapport	
Civilité, prénom, nom	M. Bernard DUMAS
Téléphone	05.34.32.38.01
Adresse électronique	bernard.dumas@univ-tlse3.fr
Date de rédaction	09/2022

Si différent du rédacteur, indiquer un contact pour le projet	
Civilité, prénom, nom	
Téléphone	
Adresse électronique	

Liste des partenaires présents à la fin du projet (société/organisme et responsable scientifique)	LRSV UMR5546 CNRS-Université Toulouse 3 – Toulouse INP (Partenaire 1) DE SANGOSSE (Partenaire 2) I2BC CNRS-Université Paris Saclay-CEA (partenaire 3)
---	---

B RESUME CONSOLIDE PUBLIC

Ce résumé est destiné à être diffusé auprès d'un large public pour promouvoir les résultats du projet, il ne fera donc pas mention de résultats confidentiels et utilisera un vocabulaire adapté mais n'excluant pas les termes techniques. Il en sera fourni une version française et une version en anglais. Il est nécessaire de respecter les instructions ci-dessous.

B.1 INSTRUCTIONS POUR LES RESUMES CONSOLIDES PUBLICS

Les résumés publics en français et en anglais doivent être structurés de la façon suivante.

Titre d'accroche du projet (environ 80 caractères espaces compris)

Titre d'accroche, si possible percutant et concis, qui résume et explicite votre projet selon une logique grand public : il n'est pas nécessaire de présenter exhaustivement le projet mais il faut plutôt s'appuyer sur son aspect le plus marquant.

Les deux premiers paragraphes sont précédés d'un titre spécifique au projet rédigé par vos soins.

Titre 1 : situe l'objectif général du projet et sa problématique (150 caractères max espaces compris)

Paragraphe 1 : (environ 1200 caractères espaces compris)

Le paragraphe 1 précise les enjeux et objectifs du projet : indiquez le contexte, l'objectif général, les problèmes traités, les solutions recherchées, les perspectives et les retombées au niveau technique ou/et sociétal

Titre 2 : précise les méthodes ou technologies utilisées (150 caractères max espaces compris)

Paragraphe 2 : (environ 1200 caractères espaces compris)

Le paragraphe 2 indique comment les résultats attendus sont obtenus grâce à certaines méthodes ou/et technologies. Les technologies utilisées ou/et les méthodes permettant de surmonter les verrous sont explicitées (il faut éviter le jargon scientifique, les acronymes ou les abréviations).

Résultats majeurs du projet (environ 600 caractères espaces compris)

Faits marquants diffusables en direction du grand public, expliciter les applications ou/et les usages rendus possibles, quelles sont les pistes de recherche ou/et de développement originales, éventuellement non prévues au départ. Préciser aussi toute autre retombée= partenariats internationaux, nouveaux débouchés, nouveaux contrats, start-up, synergies de recherche, pôles de compétitivités, etc.

Production scientifique et brevets depuis le début du projet (environ 500 caractères espaces compris)

Ne pas mettre une simple liste mais faire quelques commentaires. Vous pouvez aussi indiquer les actions de normalisation

Illustration

Une illustration avec un schéma, graphique ou photo et une brève légende. L'illustration doit être clairement lisible à une taille d'environ 6cm de large et 5cm de hauteur. Prévoir une résolution suffisante pour l'impression. Envoyer seulement des illustrations dont vous détenez les droits.

Informations factuelles

Rédiger une phrase précisant le type de projet (recherche industrielle, recherche fondamentale, développement expérimental, exploratoire, innovation, etc.), le coordonnateur, les partenaires, la date de démarrage effectif, la durée du projet, l'aide ANR et le coût global du projet, par exemple « Le projet XXX est un projet de recherche fondamentale coordonné par xxx. Il associe aussi xxx, ainsi que des laboratoires xxx et xxx). Le projet a commencé en juin 2006 et a duré 36 mois. Il a bénéficié d'une aide ANR de xxx € pour un coût global de l'ordre de xxx € »

B.2 RESUME CONSOLIDE PUBLIC EN FRANÇAIS

Suivre impérativement les instructions ci-dessus.

Une bactérie du sol pour la protection des plantes contre les maladies

Paragraphe 1 : Mode d'action d'une bactérie du sol capable de lutter contre les microorganismes pathogènes de plantes

Les Streptomycètes sont des bactéries du sol retrouvées dans une large diversité d'habitats naturels et en particulier au niveau de la rhizosphère, une zone à proximité immédiate des racines des plantes. Ces microorganismes sont caractérisés par leur capacité à produire une immense diversité de métabolites spécialisés présentant notamment des activités anti-bactériennes et anti-fongiques. Ainsi, plus des 2/3 des antibiotiques utilisés en médecine ont pour origine des Streptomycètes. Des études récentes ont montré que les Streptomycètes jouaient également un rôle important dans la santé des plantes en entrant en compétition avec des microorganismes phytopathogènes. Dans ce contexte, l'identification et la caractérisation de souches de Streptomycètes bénéfiques pour les plantes pourraient avoir un impact majeur dans le développement de nouvelles solutions phytosanitaires respectueuses de l'environnement.

Paragraphe 2 : Décryptage par des approches biochimique et moléculaires de l'activité d'une souche de biocontrôle

Malgré leur capacité à produire des molécules actives en laboratoire, seulement quelques souches ont été utilisées jusqu'à présent pour le développement de produits phytosanitaires, suggérant qu'une meilleure connaissance de ces organismes et de leur comportement dans les milieux naturels sont nécessaires afin d'optimiser leur utilisation. Le projet STREPTOCONTROL avait pour but de comprendre l'activité biologique et d'optimiser l'utilisation d'une souche de *Streptomyces*, sélectionnée à la suite d'une stratégie de criblage visant à isoler des bactéries capables d'induire le système immunitaire des plantes et de produire des activités inhibitrices de la croissance de champignons phytopathogènes. Le premier objectif du projet STREPTOCONTROL d'identifier les métabolites spécialisés actifs de la souche sélectionnée en utilisant une combinaison d'approches génomiques, génétiques et biochimiques.

Résultats majeurs du projet

Pour atteindre nos objectifs, une séquence génomique haute qualité d'AGN23 a été obtenue et annotée, permettant de prédire les clusters de gènes impliqués dans la synthèse de métabolites spécialisés et les éléments régulateurs de ces gènes, aidant ainsi l'identification biochimique de ces métabolites. Des outils de criblage haut-débit ont été utilisés pour identifier et caractériser les fractions actives et les structures des composés ont été obtenues par analyse en spectrométrie de masse. Le deuxième objectif visait à identifier les gènes clés dans la production des métabolites d'intérêt par des études moléculaires et génétiques. Des approches de mutagenèse et d'expression hétérologue ont permis d'identifier un composé particulier produit par la souche AGN23 capable à la fois d'induire les réponses immunitaires des plantes et d'inhiber la croissance des microorganismes pathogènes. Le troisième objectif visait à comprendre le comportement de la souche dans des conditions environnementales contrôlées en présence de divers types d'espèces végétales et microbiennes. Nous avons pu montrer qu'AGN23 influençait la structuration du microbiote végétal en colonisant la surface racinaire.

Productions scientifiques et brevet depuis le début du projet

Publications :

Vergnes S, Gayrard D, Veyssière M, Toulotte J, Martinez Y, Dumont V, Bouchez O, Rey T, Dumas B (2020) Phyllosphere colonisation by a soil *Streptomyces* sp. promotes plant defense responses against fungal infection *Mol Plant Microbe Interact* 33:223-234

Gayrard D, Veyssière M, Adam K, Martinez Y, Vandecasteele C, Vidal M, Dumas B, Rey T Genomic adaptation in the CAZyome and specialised metabolism of the plant-associated *Streptomyces violaceusniger* clade. (2021) *BioRxiv*, doi: <https://doi.org/10.1101/2021.10.25.465742>

B.3 RESUME CONSOLIDE PUBLIC EN ANGLAIS

Suivre impérativement les instructions ci-dessus.

A soil bacterium for plant disease protection

Paragraph 1: Mode of action of a soil bacterium capable of controlling plant pathogenic microorganisms

Streptomycetes are soil bacteria found in a wide variety of natural habitats and in particular in the rhizosphere, a zone in close proximity to plant roots. These microorganisms are characterized by their ability to produce an immense diversity of specialized metabolites with anti-bacterial and anti-fungal activities. Thus, more than 2/3 of the antibiotics used in medicine have their origin in Streptomycetes. Recent studies have shown that Streptomycetes also play an important role in plant health by competing with phytopathogenic microorganisms. In this context, the identification and characterization of Streptomycetes strains beneficial to plants could have a major impact in the development of new environmentally friendly phytosanitary solutions.

Paragraph 2: Deciphering the activity of a biocontrol strain using biochemical and molecular approaches

Despite their ability to produce active molecules in the laboratory, only a few strains have been used so far for the development of phytosanitary products, suggesting that a better knowledge of these organisms and their behaviour in natural environments is necessary to optimize their use. The STREPTOCONTROL project aimed at understanding the biological activity and optimizing the use of a Streptomyces strain, selected following a screening strategy aimed at isolating bacteria capable of inducing the plant immune system and producing growth inhibitory activities of phytopathogenic fungi. The first objective of the STREPTOCONTROL project was to identify the specialized active metabolites of the selected strain using a combination of genomic, genetic and biochemical approaches.

Major results of the project

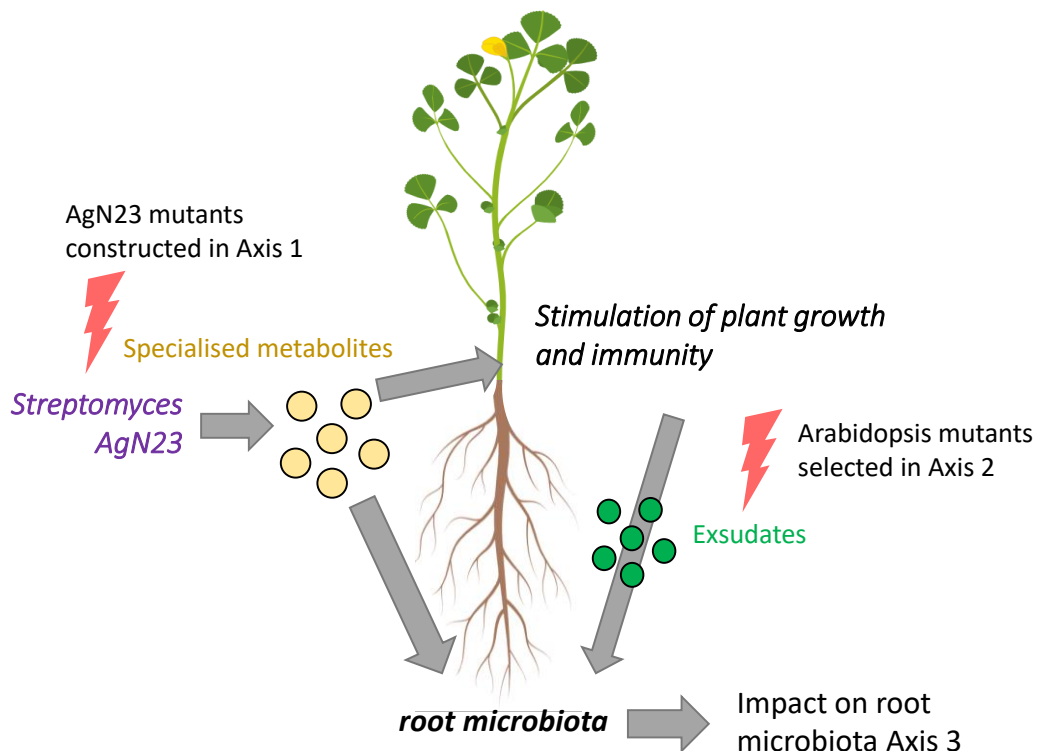
To achieve our objectives, a high-quality genomic sequence of AGN23 was obtained and annotated, allowing the prediction of gene clusters involved in the synthesis of specialized metabolites and the regulatory elements of these genes, thus aiding the biochemical identification of these metabolites. High throughput screening tools were used to identify and characterize the active fractions and the structures of the compounds were obtained by mass spectrometry analysis. The second objective was to identify the key genes in the production of the metabolites of interest by molecular and genetic studies. Mutagenesis and heterologous expression approaches were used to identify a specific compound produced by the AGN23 strain that is able to both induce plant immune responses and inhibit the growth of pathogenic microorganisms. The third objective was to understand the behaviour of the strain under controlled environmental conditions in the presence of various types of plant and microbial species. We were able to show that AGN23 influenced the structuring of the plant microbiota by colonizing the root surface.

Scientific productions and patent since the beginning of the project

Vergnes S, Gayrard D, Veyssière M, Toulotte J, Martinez Y, Dumont V, Bouchez O, Rey T, Dumas B (2020) Phyllosphere colonisation by a soil Streptomyces sp. promotes plant defense responses against fungal infection Mol Plant Microbe Interact 33:223-234

Gayrard D, Veyssière M, Adam K, Martinez Y, Vandecasteele C, Vidal M, Dumas B, Rey T Genomic adaptation in the CAZyome and specialised metabolism of the plant-associated Streptomyces violaceusniger clade. (2021) BioRxiv, doi: <https://doi.org/10.1101/2021.10.25.465742>

Illustration



C MEMOIRE SCIENTIFIQUE

Maximum 5 pages. On donne ci-dessous des indications sur le contenu possible du mémoire. Ce mémoire peut être accompagné de rapports annexes plus détaillés.

Le mémoire scientifique couvre la totalité de la durée du projet. Il doit présenter une synthèse auto-suffisante rappelant les objectifs, le travail réalisé et les résultats obtenus mis en perspective avec les attentes initiales et l'état de l'art. C'est un document d'un format semblable à celui des articles scientifiques ou des monographies. Il doit refléter le caractère collectif de l'effort fait par les partenaires au cours du projet. Le coordinateur prépare ce rapport sur la base des contributions de tous les partenaires. Une version préliminaire en est soumise à l'ANR pour la revue de fin de projet.

Un mémoire scientifique signalé comme confidentiel ne sera pas diffusé. Justifier brièvement la raison de la confidentialité demandée. Les mémoires non confidentiels seront susceptibles d'être diffusés par l'ANR, notamment via les archives ouvertes <http://hal.archives-ouvertes.fr>.

Mémoire scientifique confidentiel : oui

C.1 RESUME DU MEMOIRE

Ce résumé peut être repris du résumé consolidé public.

RESUME

A soil bacterium for plant disease protection

Mode of action of a soil bacterium capable of controlling plant pathogenic microorganisms

Streptomycetes are soil bacteria found in a wide variety of natural habitats and in particular in the rhizosphere, a zone in close proximity to plant roots. These microorganisms are characterized by their ability to produce an immense diversity of specialized metabolites with anti-bacterial and anti-fungal activities. Thus, more than 2/3 of the antibiotics used in medicine have their origin in Streptomycetes. Recent studies have shown that Streptomycetes also play an important role in plant health by competing with phytopathogenic microorganisms. In this context, the identification and characterization of Streptomycetes strains beneficial to plants could have a major impact in the development of new environmentally friendly phytosanitary solutions.

Deciphering the activity of a biocontrol strain using biochemical and molecular approaches

Despite their ability to produce active molecules in the laboratory, only a few strains have been used so far for the development of phytosanitary products, suggesting that a better knowledge of these organisms and their behaviour in natural environments is necessary to optimize their use. The STREPTOCONTROL project aimed at understanding the biological activity and optimizing the use of a Streptomyces strain, selected following a screening strategy aimed at isolating bacteria capable of inducing the plant immune system and producing growth inhibitory activities of phytopathogenic fungi. The first objective of the STREPTOCONTROL project was to identify the specialized active metabolites of the selected strain using a combination of genomic, genetic and biochemical approaches.

Major results of the project

To achieve our objectives, a high-quality genomic sequence of AGN23 was obtained and annotated, allowing the prediction of gene clusters involved in the synthesis of specialized metabolites and the regulatory elements of these genes, thus aiding the biochemical identification of these metabolites. High throughput screening tools were used to identify and characterize the active fractions and the structures of the compounds were obtained by mass spectrometry analysis. The second objective was to identify the key genes in the production of the metabolites of interest by molecular and genetic studies. Mutagenesis and heterologous expression approaches were used to identify a specific compound produced by the AGN23 strain that is able to both induce plant immune responses and inhibit the growth of pathogenic microorganisms. The third objective was to understand the behaviour of the strain under controlled environmental conditions in the presence of various types of plant and microbial species. We were able to show that AGN23 influenced the structuring of the plant microbiota by colonizing the root surface.

C.2 ENJEUX ET PROBLEMATIQUE, ETAT DE L'ART

Présenter les enjeux initiaux du projet, la problématique formulée par le projet, et l'état de l'art sur lequel il s'appuie. Présenter leurs éventuelles évolutions pendant la durée du projet (les apports propres au projet sont présentés en C.4).

Among the diverse soil-borne bacteria and fungi relevant for agriculture, the *Streptomyces* genus, which has been highlighted in medical drug discoveries, is a major component of the plant microbiota (Bulgarelli et al. 2013). Importantly, several studies revealed that high densities of antagonistic *Streptomyces* are associated with plant disease suppression in many soils (Kinkel et al., 2012). Moreover, some *Streptomyces* are plant endophytes with potential roles in plant growth regulation. These activities are correlated with the numerous metabolites they produce and miscellaneous enzymatic activities. Thus, *Streptomyces* are prime candidates to develop new microbial-based plant protection products. To our knowledge, only four *Streptomyces* strains (*S. lydicus* WYEC108, *S. violaceusniger* YCED9, *S. griseoviridis* K61, and *S. saraceticus* KH400) are included in six distinct commercial preparations marketed for biocontrol of fungal and bacterial soil diseases (Hamedi and Mohammadipanah, 2014). These strains are usually very versatile in the phytopathogens they can control owing to the antifungal metabolites they produce and the broad impact of their chitinases and glucanases. Products such as Actinovate® (*Streptomyces lydicus* WYEC 108) and Mycostop® (*Streptomyces griseoviridis* K61) are restricted to soil treatments. By contrast, three purified metabolites synthesized by *Streptomyces* spp. (Avermectin, polyoxin D, streptomycin, and kasugamycin) are currently distributed as sprayed foliar fungicides, bactericides or insecticides. The active compounds were discovered decades ago and target extremely conserved biological processes in microbes, suggesting that they can broadly affect the plant microbiome.

Up to now, the complex biology of *Streptomyces* has mainly received tremendous attention from academic and industrial research which has attempted to identify bioactive metabolites with applications in human diseases. As a consequence, extensive background knowledge exists regarding the lifecycle of these organisms and the regulation of metabolite biosynthesis. The advent of genome-sequencing technologies revolutionized the mining of *Streptomyces* metabolites produced by non-ribosomal peptide synthetase (NRPS) and polyketide synthetase (PKS) biosynthetic gene clusters. Comparative genomic analyses have revealed the high diversity of closely related *Streptomyces* strains in their SMBGCs content and expression. **How and why these pathways are activated, and their biological functions in nature, remain unclear. Thus, addressing these questions in the frame of the STREPTOCONTROL project will enable further biotechnological innovations.** We are now in a position to reveal the enormous hidden potential of *Streptomyces* in terms of secondary metabolite production.

Natural product discovery and study in the omics era

Research in the field of *Streptomyces* natural products has been profoundly impacted by the advent of NGS technologies and of new mass spectrometry methodologies, such as metabolomics and molecular networking. Nowadays, the search for specialized metabolites produced by a bacterial strain begins, in most cases, with the sequencing of the strain's genome. The next step consists in exploring the genome for genes involved in specialized metabolism (usually clustered in bacteria). To help genome mining, bioinformatic tools have been developed, such as antiSMASH, ClusterFinder or NaPDoS (Medema and Fischbach, 2015). Most of these tools are based on the search for sequence similarities with genes/proteins

known to be involved in specialized metabolism (e.g. nonribosomal peptide synthetases (NRPS), polyketide synthases (PKS) or terpene synthase). A few tools, however, explore other options including phylogenetic mining or comparative genomic mining. **The laboratory of partner 3 has recently developed one of these tools aiming at identifying and exploring genomic islands, known to be enriched in specialized metabolite biosynthetic gene clusters (SMBGCs).**

Once SMBGCs of interest have been identified, the isolation of specialized metabolites may be facilitated using mass-spectrometry and NMR analyses of culture media (Henke and Kelleher, 2016). However, these approaches can be fruitful solely if the metabolites are produced in the culture conditions tested. Indeed, in *Streptomyces*, specialized metabolism is subjected to a complex network of regulation, and only some metabolites among the diverse metabolites potentially produced by the strain will be produced in a given condition (see next paragraph). Finding conditions in which the SMBGCs of interest are expressed is thus essential, and various methods have been developed to activate silent SMBGCs and enable the production of metabolites (Rutledge and Challis, 2015). Finally, once a link between a SMBGC and a metabolite has been established, there is a large toolkit of available genetic tools (TAR cloning, SMBGC refactoring or genome editing based on the CRISPR-Cas9 technology for example) to characterise specific SMBGCs.

Regulation of specialized metabolism

The regulation of specialized metabolite biosynthesis in *Streptomyces* bacteria is complex and controlled at multiple levels (Bekiesch et al., 2016)(Netzker et al., 2015). At the transcriptional level, SMBGCs often contain one or several transcriptional regulators (called cluster-situated regulators, CSR) that control the transcription of the biosynthetic and resistance genes. In the simplest cases, only one CSR is encoded within the SMBGC and directly controls the expression of all the genes of the cluster. However, in some cases, the expression of the biosynthetic genes can be controlled by the interplay of several CSRs that form a complex regulatory cascade for example in the regulation of tylosin or pristnamycin biosynthesis. In these cases, regulation by signalling molecules (γ -butyrolactones (GBL), furanes) often constitute a higher level of transcriptional regulation. The gene encoding the signalling molecule receptor is generally encoded within the cluster, but the GBL biosynthesis genes can be located elsewhere in the genome (Polkade et al., 2016). In addition to CSRs, transcription of SMBGCs may be controlled by "global" (pleiotropic) transcription regulators responding to signals of nutrient limitation (phosphate, nitrogen...), stress (pH, levels of dissolved oxygen...) or other not well-known, direct or indirect environmental signals. Finally, regulation of specialized metabolites production can also occur at the translation or at the protein level (protein acetylation, pupylation, studied in the laboratory of partner 3).

Most studies on the regulation of specialized metabolite biosynthesis have been conducted in laboratory conditions and a number of them have been performed in liquid cultures. These conditions that are far from the growth conditions encountered in environmental habitat of *Streptomyces* strains. To our knowledge, not many studies, if any, were carried out in conditions (close to) environmental condition (soil, rhizosphere...). Some studies showed that co-cultures of *Streptomyces* with other bacteria or fungi allowed the production of new specialized metabolites, suggesting the existence of a microbial

communication network inducing the expression of SMBGCs (Netzker et al., 2015). Moreover, while *Streptomyces* are commonly found in the rhizosphere (Bulgarelli et al., 2013), no data are available on the potential effect of root exudates on the expression of SMBGCs (Schrey and Tarkka, 2008). **Clearly, elucidating the role of plants in the regulation of production of specialised metabolites by *Streptomyces* is of prime importance in view of using them in plant protection products.**

C.3 APPROCHE SCIENTIFIQUE ET TECHNIQUE

The major scientific objectives of the project were i) to characterize the anti-fungal compounds and plant defense stimulators produced by AGN23 ii) to identify, through forward and reverse genetic approaches the SMBGCs involved in bioactive compounds synthesis iii) to study the regulation of their production in various growth conditions, notably in the soil in contact of plant roots and in presence of fungal pathogens. To reach this goal we divided the project in four experimental Tasks which were started independently.

Task 1: Genomic and transcriptomic analysis of *Streptomyces* AGN23: (Task leader Partner 1)

Objectives: i) Production of a full-length sequence of AGN23 genome to detect candidates SMBGCs ii) Perform genome resequencing of AGN23 mutants of interest iii) Utilise RNAseq NGS to study AGN23 transcriptome, improve model genes prediction, assess SMBGCs regulation and gain insights into SMBGCs associated to bioactivities with differential transcriptomic

Task 2: Identification of the SMBGCs involved in the production of antifungals and plant defense elicitors by forward and reverse genetics (Task leader Partner 2)

Objectives: i) Identification of the SMBGCs directing the biosynthesis of the antifungals and plant defence elicitors with reverse genetic using deletion of SMBGC candidates ii) Functional characterisation of the identified SMBGCs by studying its regulation in diverse controlled conditions and in environmental conditions.

Task 3: Biochemical identification of active compounds (Task leader Partner 3)

Objectives: Linking AGN23 bioactivities to SMBGCs and their cognate metabolites using the analysis of crude extract with differential bioactivities by solvent extraction, HPLC, Mass Spectrometry and NMR analysis.

Task 4: Regulation of the production of active compounds upon plant treatments and role in plant development and protection (Task leader Partner 1)

Objective: i) To study the regulation of SMBGCs when inoculated on plant roots in presence or in absence of fungal phytopathogens ii) To evaluate the impact of AGN23 on plant microbiota and development.

C.4 RESULTATS OBTENUS

Positionner les résultats par rapports aux livrables du projet et aux publications, brevets etc. Revisiter l'état de l'art et les enjeux à la fin du projet.

Task 1: Genomic and transcriptomic analysis of Streptomyces AGN23: (Task leader Partner 1)

The AGN23 genomic information generated using MiSeq paired-end sequencing technology highlights the strain potential for synthesis of bioactive compounds. Numerous SMBGCs sequences were identified in the 9Mb assembled sequences. However, the genome sequence was still fragmented into hundreds of scaffolds and some SMBGCs could not be entirely assembled using this technology. To gain further insights in the genome and SMBGCs organization of AGN23, we performed a PacBIO® SMRT sequencing which uncover the complete physical sequence of the strain. Using the ANTISMASH SMBGC annotation tool the repertoire of gene clusters involved in the synthesis of SMBGs was established. Synteruptor, a bioinformatics tool based on the detection of genomic island developed in the laboratory of partner 3 was used to support gene model annotation. Additionally, RNAseq experiment using HiSeq3000 was performed to support gene model prediction (Gayrard et al., submitted for publication; Gayrard et al., BioRxiv 2022, 10.1101/2021.10.25.465742)

To identify culture conditions allowing the production of high level of bioactive compounds, wild type AGN23 was screened on a gallery of growth conditions using the Biolog MicroPlates™ technology. In parallel, the cell free supernatant was used to screen antifungal properties and plant elicitation activities as described previously. This approach led to the identification of a sugar reducing the biosynthesis of previously identified candidate metabolites but inducing antifungal activity. Metabolic analysis confirmed that new compounds were more produced by the strain in that condition and suggests that the antifungal activity of the strain is regulated on different bases in that culture condition. Transcriptomic analysis confirmed that observation by measuring the differential expression of many genes belonging to both central and specialized metabolism (Gayrard D., PhD Thesis, 2020).

Task 2: Identification of the SMBGCs involved in the production of antifungals and plant defense elicitors by forward and reverse genetics (Task leader Partner 2)

Reverse genetics

To identify the SMBGCs associated to bioactive compounds production, candidate clusters were identified based on known activities of the specialised metabolites. Among them, we identified galbonolides since these compounds has been shown to inhibit the activity of Inositol Phosphoceramide Synthase (IPCS) an enzyme involved in the sphingolipid biosynthetic pathway of plants and fungi. Inhibition of IPCS induces fungal death whereas in plants, alteration of the sphingolipid metabolism has been shown to induce the hypersensitive response, characterized by a programmed cell death and induction of immune responses. Since these two characteristics corresponds to the observed activities of AGN23 culture filtrate, AGN23 strains disrupted in the galbonolide biosynthetic gene cluster were constructed. The lack of galbonolide production was

verified in 5 mutant strains and the culture medium of these strains was tested for their fungicide activity and ability to induce plant defense responses. Unexpectedly, the antifungal activity of these strains (IC₅₀) decrease by more than 50% compared to the wild type strain showing that galbonolides are the major compounds involved in the antifungal activity of AGN23 despite its ability to produce other known antifungal compounds such as nigericin or niphymycin. The impact of mutation of the galbonolide cluster was also clearly observed on the induction of the plant hypersensitive response. Together, this work demonstrates that galbonolides are key compounds involved in the biological activity of the AGN23 strain.

Task 3: Biochemical identification of active compounds (Task leader Partner 3)

According to the results described above, galbonolides were biochemically detected by using standard biochemistry approaches and MS/MS. To be sure that the identified cluster was necessary and sufficient to produce galbonolides, a DNA fragment encompassing all the biosynthetic cluster was introduced into the genome of heterologous *Streptomyces* species, *S. lividans* TK24 and *S. coelicolor* M1146. Optimization of culture conditions allowed the production of detectable amounts of galbonolides in culture media of the *S. lividans* strains demonstrating the validity of the predicted AGN23 cluster.

Task 4: Regulation of the production of active compounds upon plant treatments and role in plant development and protection (Task leader Partner 1)

Influence of fungal and plant signals on the expression of SMBGCs

An untargeted metabolomics approach of *Arabidopsis* roots inoculated by AGN23 showed that the plants induce strongly the secretion of camalexin, a major plant defence compounds against fungi and oomycete. AGN23 treatment with camalexin *in vitro* assays showed that the bacteria can resist to concentrations of camalexin that inhibits the growth of fungal pathogens. Therefore we hypothesized that camalexin production by *Arabidopsis* in response to AGN23 in an important mechanisms toward the plant protection triggered by the bacteria. We inoculated phytoalexin deficient 3 (*pad3*) mutants that are unable to produce camalexin and showed that this mutant were still colonized by AGN23 but the bacteria could not protect the plant from the root pathogen *Phytophthora capsici* thus validating our previous hypothesis.

Construction of AGN23 reporter strains

Reporter AGN23 strains expressing the GUS (beta glucuronidase) gene under the control of constitutive or galbonolide promoters were obtained. Preliminary analyses showed that the galbonolide is constitutively expressed, in culture media or in contact with plant roots.

Further work will be performed to determine the effect of fungal or plant compounds on the expression of the galbonolide cluster.

Effect of long-term exposure of AGN23 on plant microbiota and plant development

The effect of long-term exposure to AGN23 of the dicots *A. thaliana* and *M. truncatula* roots on plant development and rhizosphere microbiota was investigated. As a preliminary characterization, a metagenomic analysis of the soil used in this experiment (potting soil) was performed to get a global view of bacterial communities by 16S RNA (bacteria) and ITS (fungi)

profiling. Then, soils inoculated with AGN23 was used to grow the plant species. Plant development was quantified showing a negative effect of AGN23 on plant development. At the end of the experiments, bacterial and fungal profiling of the soils was determined to evaluate the effect of AGN23 on the soil microbiota. Interestingly, we observed the development of AGN23 along the root axis, in the rhizosphere. Despite AGN23 ability to produce antimicrobial compounds, microbiome analysis (bacteria and fungi) showed that the presence of AGN23 significantly increased α diversity of the bacterial and fungal microbiota and altered bacterial and fungal β diversity at the phyla level . This effect could be due to the limitation of the development of abundant species, reducing the competition and allowing development of slow-growing strains.

C.5 EXPLOITATION DES RESULTATS

Most of the results presented above are or will be published in high-ranked publications. Moreover, these results will be useful to understand the mode of the AGN23 strain to improve its efficacy as a biocontrol product and also to prepare the regulatory leading to its commercialization

C.6 DISCUSSION

Discussion sur le degré de réalisation des objectifs initiaux, les verrous restant à franchir, les ruptures, les élargissements possibles, les perspectives ouvertes par le projet, l'impact scientifique, industriel ou sociétal des résultats.

Most of the objectives initially defined have been achieved. We clearly identified the major role of one class of metabolites, galbonolides, as key player in the biological activity of the strain in the rhizosphere by a combination molecular genetics and metabolomic approach. Importantly, the intense collaboration between the partners and their complementary allowed to make rapid progress in the project. This project opens new perspectives and scientific questions notably regarding the role of Streptomycetes in shaping the rhizospheric microbiota.

C.7 CONCLUSIONS

The collaboration developed during this project was very fruitful, bringing together complementary skills in *Streptomyces* genetics, plant-microbe interactions and the industrial development of biocontrol products. The results obtained established the major role a streptomycete metabolite in plant- and microbe- interactions in the rhizosphere, and highlight the major role of these bacteria in shaping the plant microbiote.

C.8 REFERENCES

D LISTE DES LIVRABLES

Quand le projet en comporte, reproduire ici le tableau des livrables fourni au début du projet. Mentionner l'ensemble des livrables, y compris les éventuels livrables abandonnés, et ceux non prévus dans la liste initiale.

Date de livraison	N°	Titre	Nature (rapport, logiciel, prototype, données, ...)	Partenaires (souligner le responsable)	Commentaires
	1				

E IMPACT DU PROJET

Ce rapport rassemble des éléments nécessaires au bilan du projet et plus globalement permettant d'apprécier l'impact du programme à différents niveaux.

E.1 INDICATEURS D'IMPACT

Nombre de publications et de communications (à détailler en E.2)

Comptabiliser séparément les actions monoparttenaires, impliquant un seul partenaire, et les actions multiparttenaires résultant d'un travail en commun.

***Attention :** éviter une inflation artificielle des publications, mentionner uniquement celles qui résultent directement du projet (postérieures à son démarrage, et qui citent le soutien de l'ANR et la référence du projet).*

		Publications multiparttenaires	Publications monoparttenaires
International	Revue à comité de lecture		2
	Ouvrages ou chapitres d'ouvrage		
	Communications (conférence)		
France	Revue à comité de lecture		
	Ouvrages ou chapitres d'ouvrage		
	Communications (conférence)		
Actions de diffusion	Articles vulgarisation		
	Conférences vulgarisation	10	
	Autres		

Autres valorisations scientifiques (à détailler en E.3)

Ce tableau dénombre et liste les brevets nationaux et internationaux, licences, et autres éléments de propriété intellectuelle consécutifs au projet, du savoir faire, des retombées diverses en précisant les partenariats éventuels. Voir en particulier celles annoncées dans l'annexe technique).

	Nombre, années et commentaires (valorisations avérées ou probables)
--	--

Brevets internationaux obtenus	
Brevet internationaux en cours d'obtention	
Brevets nationaux obtenus	
Brevet nationaux en cours d'obtention	
Licences d'exploitation (obtention / cession)	
Créations d'entreprises ou essaimage	
Nouveaux projets collaboratifs	
Colloques scientifiques	
Autres (préciser)	

E.2 LISTE DES PUBLICATIONS ET COMMUNICATIONS

*Répertorier les publications résultant des travaux effectués dans le cadre du projet. On suivra les catégories du premier tableau de la section **Erreur ! Source du renvoi introuvable.** en suivant les normes éditoriales habituelles. En ce qui concerne les conférences, on spécifiera les conférences invitées.*

Conférence :

Gayrard D., Rey T., *et al.* Study of a *Streptomyces sp.* derived signals and their plant perception mechanisms. Pesticide Organique d'Origine Naturelle (PO2N). Perpignan 2018.

Gayrard D., Rey T. *et al.* A *Streptomyces* isolate mediating resistance against pathogens by plant immunity stimulation. Colloque ACTINO 2017. Lyon 2017.

Gayrard D, Vergnes S., Rey T *et al.* Identification of a new *Streptomyces* strain inducing plant defense responses and resistance against fungal infection. Micrope. Vienne 2017.

Gayrard D., Veyssière M., Martinez, Hortala M., Bouchez O., Rey T., Dumas B. Genome mining of *Streptomyces violaceusniger* AgN23 highlights its high potential as plant stimulant and biological control agent. Colloque ACTINO 2020, visioconférence 2020.

Hortala M., Gayrard D., Amiel A., Belmas E., Noël A., Lautru S., Rey T., Dumas B. Roots and rhizosphere colonization by a soil borne *Streptomyces* strain stimulates roots defence and development and promotes microbiota diversity. Colloque ACTINO 2020, visioconférence 2020.

Alba N., Hortala M., Gayrard D., Rey T., Dumas B., Lautru S. Study of the interactions between plants and a *Streptomyces* strain with plant defence-eliciting properties. Journées Jean Chevaugéon Bactéries, Aussois 2020.

Clement Nicolle et al colloque SFBV Montpellier2022. Molecular basis of plant defenses stimulation by the soil borne *Streptomyces* strain AgN23: characterization of a novel necrotic elicitor.

Clement Nicolle et al colloque Po2N Perpignan 2022. Molecular basis of plant defenses stimulation by the soil borne *Streptomyces* strain AgN23: characterization of a novel necrotic elicitor

Communication invité

Clement Nicolle et al AUSSOIS 2022 JJC bactéries Investigating the genomic and metabolomic features enabling plant rhizosphere colonisation by *Streptomyces violaceusniger* sp. AgN23

Rey et al *Streptomyces*: at the service of modern agriculture. Gram+ satellite Workshop, Molecular Plant Microbe Interaction Congress. Glasgow 2019.

E.3 LISTE DES ELEMENTS DE VALORISATION

*La liste des éléments de valorisation inventorie les retombées (autres que les publications) décomptées dans le deuxième tableau de la section **Erreur ! Source du renvoi introuvable.** On détaillera notamment :*

- *brevets nationaux et internationaux, licences, et autres éléments de propriété intellectuelle consécutifs au projet.*
- *logiciels et tout autre prototype*
- *actions de normalisation*
- *lancement de produit ou service, nouveau projet, contrat,...*
- *le développement d'un nouveau partenariat,*
- *la création d'une plate-forme à la disposition d'une communauté*
- *création d'entreprise, essaimage, levées de fonds*
- *autres (ouverture internationale,..)*

Elle en précise les partenariats éventuels. Dans le cas où des livrables ont été spécifiés dans l'annexe technique, on présentera ici un bilan de leur fourniture.

E.4 BILAN ET SUIVI DES PERSONNELS RECRUTES EN CDD (HORS STAGIAIRES)

Ce tableau dresse le bilan du projet en termes de recrutement de personnels non permanents sur CDD ou assimilé. Renseigner une ligne par personne embauchée sur le projet quand l'embauche a été financée partiellement ou en totalité par l'aide de l'ANR et quand la contribution au projet a été d'une durée au moins égale à 3 mois, tous contrats confondus, l'aide de l'ANR pouvant ne représenter qu'une partie de la rémunération de la personne sur la durée de sa participation au projet.

Les stagiaires bénéficiant d'une convention de stage avec un établissement d'enseignement ne doivent pas être mentionnés.

Les données recueillies pourront faire l'objet d'une demande de mise à jour par l'ANR jusqu'à 5 ans après la fin du projet.

Identification				Avant le recrutement sur le projet			Recrutement sur le projet				Après le projet				
Nom et prénom	Sexe H/F	Adresse email (1)	Date des dernières nouvelles	Dernier diplôme obtenu au moment du recrutement	Lieu d'études (France, UE, hors UE)	Expérience prof. Antérieure, y compris post-docs (ans)	Partenaire ayant embauché la personne	Poste dans le projet (2)	Durée missions (mois) (3)	Date de fin de mission sur le projet	Devenir professionnel (4)	Type d'employeur (5)	Type d'emploi (6)	Lien au projet ANR (7)	Valorisation expérience (8)
HORTALA Marion	F	marion.hortala@gmail.com	Juin 2022	Ingénieure ENSAT	Toulouse		P1	IE			Chargée de Mission Chambre d'Agriculture Occitanie	Autre public	Chargée de mission	Non	oui
GAYRARD Damien	H	gayrard.damien@gmail.com	Septembre 2022	Doctorat UPS	Toulouse		P2	Post-Doc			Post-Doctorat étranger	EPIC	Post-Doctorat	Non	oui
CARCAGNO Mélanie	F	melanie.carcagno@orange.fr	Septembre 2022	Master UPS	Toulouse		P2	IE			IE, France	EPIC	IE	Non	oui
NOEL Alba	F	alba.noel@univ-angers.fr	Juillet 2022	Doctorat	France		P3	Post-doc	24 mois	31/03/2020	Maître de conférence, IUT Angers	enseignement et recherche publique	enseignant-chercheur,	Non	oui
LONG Maya	F	maya.long@i2bc.paris-saclay.fr		Licence professionnelle	France		P3	AI	24 mois	31/10/2022					

Aide pour le remplissage

(1) **Adresse email** : indiquer une adresse email la plus pérenne possible

(2) **Poste dans le projet** : post-doc, doctorant, ingénieur ou niveau ingénieur, technicien, vacataire, autre (préciser)

(3) **Durée missions** : indiquer en mois la durée totale des missions (y compris celles non financées par l'ANR) effectuées sur le projet

- (4) **Devenir professionnel** : CDI, CDD, chef d'entreprise, encore sur le projet, post-doc France, post-doc étranger, étudiant, recherche d'emploi, sans nouvelles
- (5) **Type d'employeur** : enseignement et recherche publique, EPIC de recherche, grande entreprise, PME/TPE, création d'entreprise, autre public, autre privé, libéral, autre (préciser)
- (6) **Type d'emploi** : ingénieur, chercheur, enseignant-chercheur, cadre, technicien, autre (préciser)
- (7) **Lien au projet ANR** : préciser si l'employeur est ou non un partenaire du projet
- (8) **Valorisation expérience** : préciser si le poste occupé valorise l'expérience acquise pendant le projet.

Les informations personnelles recueillies feront l'objet d'un traitement de données informatisées pour les seuls besoins de l'étude anonymisée sur le devenir professionnel des personnes recrutées sur les projets ANR. Elles ne feront l'objet d'aucune cession et seront conservées par l'ANR pendant une durée maximale de 5 ans après la fin du projet concerné. Conformément à la loi n° 78-17 du 6 janvier 1978 modifiée, relative à l'Informatique, aux Fichiers et aux Libertés, les personnes concernées disposent d'un droit d'accès, de rectification et de suppression des données personnelles les concernant. Les personnes concernées seront informées directement de ce droit lorsque leurs coordonnées sont renseignées. Elles peuvent exercer ce droit en s'adressant l'ANR (<http://www.agence-nationale-recherche.fr/Contact>).