

Titre du projet	Nématodes vecteurs de bactéries Entomopathogènes et Peptide Antimicrobien de <i>Xenorhabdus</i> (NEPAX)
Mots Clefs (5)	Antimicrobiens, Spectrométrie de masse haute résolution, Identification/Quantification, Bioinformatique.
Nature de la demande (M1, M2, Ingénieur, ...)	M1/M2 ou ingénieur
Encadrants	Adrien Chouchou, adrien.chouchou@umontpellier.fr , Institut des Biomolécules Max Mousseron, Alyssa Carré-Mlouka, alyssa.carre-mlouka@umontpellier.fr Laboratoire DGIMI Diversité, Génomes et Interactions Microorganismes Insectes Université de Montpellier
Date de début de stage souhaité	Février-Mars 2024
Durée de stage souhaité (en mois)	4-6 mois
Contexte	Afin de lutter contre l'insécurité alimentaire mondiale, la lutte contre les insectes ravageurs représente un enjeu majeur. En accord avec l'approche « santé globale », les agents de biocontrôle, dont font partie les complexes némato-bactériens entomopathogènes (NEPs), sont considérés comme des moyens de lutte respectueux de l'environnement. Les NEPs du genre <i>Steinernema</i> sont des vecteurs de bactéries (<i>Xenorhabdus</i>) qui provoquent une septicémie à l'origine de la mort des larves d'insectes. Le cadavre de l'insecte sert alors de ressource nutritionnelle essentielle à la reproduction des nématodes et leur réassociation avec le symbiote bactérien. Il abrite également une communauté microbienne dense et diversifiée ¹ , dont l'équilibre peut influencer sur la pérennisation du cycle de reproduction des NEPs donc sur leur efficacité en tant que moyen de biocontrôle. Dans ce cadre, nous nous intéressons à une famille de lipocyclopeptides à activité antimicrobienne produits par <i>Xenorhabdus</i> , les PAXs (Peptide Antimicrobials from <i>Xenorhabdus</i> ²), pouvant jouer un rôle dans l'écologie microbienne au cours du cycle némato-bactérien.
Objectifs	Ce projet se focalisera sur la caractérisation et la quantification de la diversité structurale des PAXs produits par <i>Xenorhabdus</i> dans le contexte des interactions microbiennes au sein des larves en décomposition, à l'aide de techniques analytiques par spectrométrie de masse à haute résolution adaptées aux petites molécules. L'objectif sera de mettre au point des méthodologies analytiques, dans des milieux biologiques de complexité croissante : culture de <i>Xenorhabdus</i> en milieu liquide, co-cultures de <i>Xenorhabdus</i> en milieu liquide avec les autres microorganismes rencontrés au cours du cycle némato-bactérien puis co-cultures dans une larve d'insecte en décomposition. Ces travaux permettront de définir les facteurs biotiques influant sur la diversité et la quantité de PAXs produits. Cette démarche constitue un défi

	<p>analytique dans le contexte de la larve d'insecte en décomposition, abritant une communauté microbienne diverse et représentant un milieu d'une grande complexité chimique.</p>
<p>Méthodologie</p>	<p>Nous débuterons par une étude <i>in vitro</i> avec des cultures ou co-cultures bactériennes dans un milieu mimant les cadavres d'insectes (insectes sains broyés, lyophilisés et re-suspendus en solution aqueuse), avant de poursuivre par une étude <i>in vivo</i> dans la larve en décomposition. Une approche transdisciplinaire combinant des compétences en biologie et en chimie analytique sera mise en place pour mener à bien ce projet.</p> <p>Les deux grands objectifs du projet seront :</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. <u>Détermination de la diversité des PAXs</u> <p>Nous proposons de mettre à profit un mutant (construit au laboratoire DGIMI) inactivé pour le gène <i>paxA</i>, codant une enzyme de type NRPS (Non Ribosomal Peptide Synthetase) impliquée dans la biosynthèse des PAXs³. Le profil métabolique (LC-HRMS) du mutant <i>paxA</i> sera déterminé par rapport à la souche sauvage, afin de mettre en évidence les pics différentiels et d'identifier l'ensemble des métabolites de la famille des PAXs. Des données de la littérature³, ainsi que des données préliminaires, suggèrent qu'il existe plus d'une dizaine de dérivés PAXs, différant dans la séquence peptidique ou dans la longueur de la chaîne d'acide gras. Des analyses de spectrométrie de masse en tandem (MS²) permettront de définir une signature spectrale des PAXs, et d'identifier d'éventuels nouveaux dérivés de cette famille chimique. Ceux-ci pourront être purifiés par chromatographie en phase liquide préparative puis analysés par résonance magnétique nucléaire (RMN) en vue d'une élucidation structurale. Ces expériences seront menées sur des équipements d'ultra haute résolution (spectromètre de masse Orbitrap IQ-X Tribrid et spectromètre RMN 600MHz) disponibles au sein du parc instrumental du Laboratoire de Mesures Physiques de l'Université de Montpellier (Bâtiment Chimie Balard).</p> <ol style="list-style-type: none"> 2. <u>Identification et Quantification des PAXs</u> <p>Différentes techniques d'extraction (extraction liquide-liquide avec des solvants de différentes polarités à partir des surnageants de cultures ; extraction solide-liquide à partir de culots cellulaires ou de larves broyées d'insectes infectés) seront testées afin de développer une méthode d'analyse des PAXs qui soit sensible et reproductible. Celle-ci sera basée sur le suivi des transitions pour les ions précurseurs d'intérêt [M+H]⁺ vers les ions fragments spécifiques associé à une méthodologie de quantification par étalonnage interne (en utilisant un analogue synthétique disponible au laboratoire).⁴ Une approche par réseaux moléculaires permettra de mettre en évidence des structures communes entre les PAX connus dans la littérature et ceux nouvellement identifiés.</p> <p>Le laboratoire DGIMI dispose d'une large collection de souches de <i>Xenorhabdus</i>, dont l'efficacité de réassociation avec les NEPs et la capacité entomopathogène sont connus. Ainsi, il sera possible de travailler sur</p>

	différentes espèces de <i>Xenorhabdus</i> afin de corréliser les données concernant les PAXs (diversité structurale et quantité produite en fonction des conditions) avec la capacité entomopathogène, dans un objectif d'optimisation des méthodes de biocontrôle.
Résultats attendus	<p>Les compétitions microbiennes médiées par des substances antimicrobiennes sont considérées essentielles à l'écologie microbienne des holobiontes tels que les insectes ravageurs⁵. Si des études descriptives de la composition des communautés microbiennes ont été menées, les mécanismes à l'origine de la dynamique de ces populations restent inexplorés. Nous faisons l'hypothèse que les PAXs produits par <i>Xenorhabdus</i> pourraient jouer un rôle dans la matrice biologique complexe que représente le cadavre d'insecte, dans lequel se reproduisent les nématodes et se développe une communauté microbienne dense. Les données obtenues sur les déterminants biotiques de la diversité structurale et la quantité des PAXs produits dans la phase nécrotrophe pourront permettre d'apporter des pistes sur le rôle fonctionnel des PAXs.</p> <p>A terme, il pourrait être possible de mettre en évidence, en plus de l'effet antimicrobien des PAXs, de nouvelles fonctions de ce type de molécules dans les interactions sociales entre bactéries (mutualisme, coopération par exemple). Ces études fonctionnelles sur les substances naturelles pourraient également ouvrir la voie vers la découverte de nouveaux composés bioactifs valorisables, comme cela a été le cas pour la darobactine issue de <i>Photorhabdus</i> ou l'odilorhabdine de <i>Xenorhabdus</i>⁵, deux nouveaux antibiotiques prometteurs.</p>
Compétences recherchées	Compétences en chimie analytique (spectrométrie de masse à haute résolution) avec un savoir-faire en traitement de données (outils analytiques et bioinformatiques pour l'identification structurale et la quantification de composés d'intérêt). Des connaissances/compétences en microbiologie seraient un plus.

Références :

- Ogier J-C, Pagès S, Frayssinet M, Gaudriault S. Entomopathogenic nematode-associated microbiota: from monoxenic paradigm to pathobiome. *Microbiome*. 2020;8(1):25. doi:10.1186/s40168-020-00800-5.
- Gualtieri M, Aumelas A, Thaler J-O. Identification of a new antimicrobial lysine-rich cyclolipopeptide family from *Xenorhabdus nematophila*. *The Journal of Antibiotics*. 2009; 62: 295. doi: 10.1038/ja.2009.31.
- Fuchs S-W, Proschak A, Jaskolla T-W, Karas M, Bode H-B. Structure elucidation and biosynthesis of lysine-rich cyclic peptides in *Xenorhabdus nematophila*. *Organic 1 Biomolecular Chemistry*. 2011; 9:3130. doi: 10.1039/c1ob05097d.
- Chouchou A, Marion B, Enjalbal C et al. Liquid chromatography-electrospray ionization-tandem mass spectrometry method for quantitative estimation of new imiquinaline leads with potent anticancer activities in rat and mouse plasma. Application to a pharmacokinetic study in mice. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 2018; 148:369–379. doi:10.1016/j.jpba.2017.10.025.
- Heryanto C, Eleftherianos I. Nematode endosymbiont competition: Fortune favors the fittest. *Mol Biochem Parasitol*. 2020;238:111298. doi:10.1016/j.molbiopara.2020.111298.