

Prix de mémoire de fin d'étude de la Fondation Xavier Bernard

ANNEE : 2020

TITRE : Immunité végétale : caractérisation métabolomique des exsudats racinaires de plantes d'intérêt agronomique (pois et féverole) lors de l'infection par l'agent oomycète pathogène *Aphanomyces euteiches*

AUTEUR : Mélanie FORTIER

ECOLE : L'Institut Agro - Agrocampus Ouest Rennes

Laboratoire d'accueil : Laboratoire Glyco-MEV EA4358 et laboratoire COBRA UMR6014, Université de Rouen Normandie

Rapporteur : Marie-Thérèse ESQUERRÉ-TUGAYÉ

Résumé (français et anglais)

La pourriture racinaire, causée par le pathogène tellurique oomycète *Aphanomyces euteiches*, peut entraîner chez le pois¹, jusqu'à 80% de pertes de rendement alors que la féverole est moins sensible à cet agent pathogène. Hormis la rotation de cultures, il n'existe aucun moyen de protection efficace. Ainsi, il est nécessaire de mieux comprendre son processus infectieux, et la mise en place des défenses de la plante afin de développer de nouvelles méthodes de lutte. L'objectif est de comparer les composés émis par les racines de pois et de féverole, ou exsudats racinaires, potentiellement actifs contre *A.euteiches*. La technique d'analyse utilisée est la Résonance Magnétique Nucléaire. Les résultats préliminaires montrent un enrichissement des exsudats en sucres chez la féverole et en acides aminés chez le pois. D'autres analyses sont indispensables pour identifier les métabolites assurant la protection racinaire de la féverole, et pour envisager un développement de la résistance du pois.

Root rot disease caused by the telluric pathogen oomycete *Aphanomyces euteiches* results in yield losses of up to 80% in peas¹ while faba beans are less susceptible to this pathogen. Except for crop rotation, there is no effective protection against this pathogen. To develop new control methods, it is therefore necessary to better understand the infectious process and the establishment of plant defenses. The aim of this study is to compare the compounds emitted by the pea and faba roots, termed root exudates possibly efficient against *A.euteiches*. The analytical technique used is Nuclear Magnetic Resonance. Preliminary results show an enrichment of exudates in sugars in faba and in amino acids in peas. Further analysis is required to identify the metabolites providing faba root protection, and to consider the development of resistance in pea.

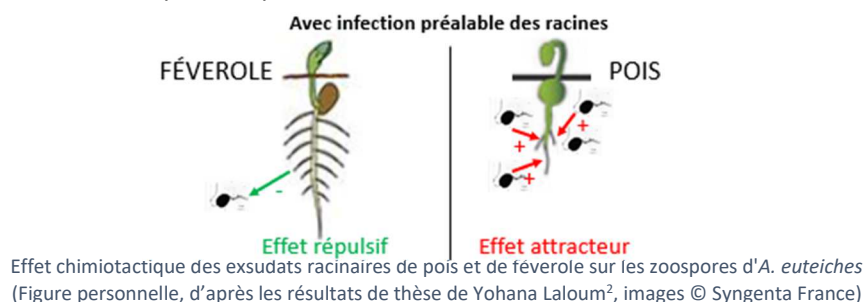
Contexte et enjeux

Les cultures de protéagineux ont des intérêts nutritionnels et agronomiques indéniables. En plus d'être sources de protéines végétales pour l'alimentation humaine et animale, elles permettent une fertilisation azotée naturelle des sols en fixant l'azote atmosphérique par association symbiotique avec des bactéries. Le pois (*Pisum sativum*) représente la culture majeure de protéagineux en France, mais la production connaît un fort déclin. En effet, ces cultures sont sensibles à de nombreux stress biotiques et abiotiques. Chez le pois, *Aphanomyces euteiches*, responsable de la pourriture racinaire, peut entraîner jusqu'à 80% de pertes de rendements en France¹ alors que les cultivars de féverole (*Vicia faba*) sont moins sensibles à cet agent pathogène. Pour promouvoir les cultures de protéagineux, il est nécessaire de stabiliser les rendements. Une meilleure compréhension des processus précoces d'infection et de la mise en place des défenses de la plante est primordiale pour développer des méthodes de lutte efficaces et respectueuses de l'environnement.

Objectifs et méthodes

Les racines émettent des exsudats dans le sol, qui sont des composés de natures très diverses. Il a été montré que les exsudats de féverole avaient un effet répulsif sur les zoospores d'*A. euteiches*. En revanche, les exsudats de pois ont un effet attractif lorsque les racines ont été préalablement infectées². Nous souhaitons donc explorer, sans *a priori*, l'exsudation différentielle des racines de pois,

sensible à l'agent pathogène *A. euteiches* et de la féverole, résistante. La méthode d'étude retenue est une approche métabolomique, c'est-à-dire une « analyse non ciblée du plus grand nombre de métabolites possible »³ dans ces exsudats. Dans ce but, il est d'abord nécessaire de choisir et d'optimiser un protocole de récolte des exsudats. La culture des plantules s'effectue en hydroponie, dans des conditions stériles. Les exsudats sont récoltés par immersion des racines dans une solution de chlorure de calcium à 0,1mM, pendant 15 minutes ou deux heures. Le milieu de récolte est centrifugé et lyophilisé, puis la poudre obtenue est dissoute dans de l'eau deutérée pour effectuer les analyses par spectroscopie RMN. Des spectres avec des signaux correspondant aux déplacements chimiques des hydrogènes des molécules sont obtenus. Ils permettent d'identifier les composés présents dans les exsudats, par comparaison avec des bases de données de RMN.



Points forts

La méthode d'analyse par Résonance Magnétique Nucléaire (RMN), souvent utilisée pour l'analyse de biofluides humains, mais peu pour des échantillons d'origine végétale, a nécessité une mise au point et une préparation adaptée aux exsudats racinaires. Cette méthode a permis l'obtention de profils métaboliques caractéristiques du pois et de la féverole. Les exsudats de pois semblent enrichis en acides aminés et ceux de féverole en sucres. Des variations du profil au sein d'une même espèce sont cependant observées. Même si tous les signaux des spectres RMN n'ont pas pu être attribués, 47 composés ont été identifiés. La majorité des molécules sont présentes chez le pois et la féverole, mais il existe également des composés spécifiques à chaque espèce : le p-cresol, la thréonine et l'acide isovalérique ont été retrouvés uniquement dans les exsudats de pois, tandis que le fructose et l'éthanol uniquement dans ceux de la féverole.

Productions scientifiques

Les résultats obtenus ont été exposés lors de présentations orales aux Journées de l'école doctorale normande de Biologie Intégrative Santé Environnement (EDnBISE)⁴ et à la conférence internationale « Plant Cell Wall Biology »⁵.

Perspectives envisagées

L'implémentation de l'analyse par spectroscopie RMN d'exsudats racinaires permet d'envisager des perspectives intéressantes pour mieux comprendre la mise en place des défenses chez le pois et la féverole. Pour poursuivre les comparaisons entre les deux espèces, et étudier la variabilité de l'exsudation en conditions de stress, des analyses d'exsudats produits après infection des racines par *A. euteiches* sont envisagées. Des répliques supplémentaires sont aussi nécessaires afin d'évaluer les variations biologiques au sein d'une espèce.

Votre appréciation personnelle

L'analyse par RMN nous a permis de détecter des métabolites dans les exsudats racinaires de pois et de féverole, de faible poids moléculaire et de classes chimiques très diverses. Dans la littérature, peu de données de RMN sont disponibles sur les exsudats racinaires. Ces résultats préliminaires sont donc encourageants dans l'objectif de développer le potentiel de la RMN dans l'analyse d'extraits végétaux. Ils pourront ensuite être appliqués à d'autres thématiques (sécheresse...).

¹ Gaulin et al. (2007) *Molecular Plant Pathology*. 8(5):539-548 ; ² Laloum (2017) *La pourriture racinaire du pois : éléments de compréhension du processus infectieux d'A. euteiches et perspectives agronomiques*. Rouen-Normandie. ; ³ Van Dam et Bouwmeester (2016) *Trends in Plant Science*. 21(3):256-265 ; ⁴ M. Fortier, L. Guilhaudis, A. Driouich, M. Vicré et M.-L. Follet-Gueye (2021). *Pisum sativum root development under water deficit; involvement of Root Extracellular Trap (RET) and exudates?* "Thesis project", Journées de l'école doctorale EDnBISE. 17 et 18 mai, 2021. ; ⁵ M.-L. Follet-Gueye, R. Castilleux, Y. Laloum, M. Fortier, E. Ancelin, A. Driouich et M. Vicré (2021). *Involvement of cell wall glyco-molecules and AC-DCs in root microbe interactions*. The 7th International Conference on Plant Cell Wall Biology. (PCWB2021). 27 juin-1er juillet, 2021.