

**TITRE DU PROJET :** Sélection de microbiotes améliorant la résistance des plantes à la sécheresse

**1) Renseignements administratifs sur la direction de thèse<sup>1</sup> (1 page maximum) :**

Directeur de thèse HDR :

Nom : BLOUIN

Prénom : Manuel

Co-directeur de thèse éventuel :

Nom : JACQUIOD

Prénom : Samuel

**2) Descriptif du projet de thèse (devra inclure les rubriques suivantes) :**

- nom et label de l'unité de recherche (ainsi que l'équipe interne s'il y a lieu)  
UMR 1347 Agroécologie, Pôle MICSOL, équipe Holobionte

- localisation

INRAE, 17 rue Sully, 21000 DIJON

- nom du directeur de thèse et du co-directeur s'il y a lieu

Directeur : Manuel Blouin

Co-directeur : Samuel Jacquiod

- adresse courriel du contact scientifique

[manuel.blouin@agrosupdijon.fr](mailto:manuel.blouin@agrosupdijon.fr)

**Contexte et état de l'art**

Sélectionner un microbiote revient sur un plan théorique à sélectionner un groupe, question longuement débattue en évolution. Cette sélection de microbiotes revêt un intérêt particulier en agriculture, à une période où les alternatives aux intrants de synthèse sont activement recherchées, dans un contexte où de nouveaux types de stress surviennent à cause des changements climatiques. Suite à la parution de l'article séminal sur la sélection de communautés microbiennes (Swenson et al. 2000) et grâce aux méthodes de séquençage haut débit, la structure du microbiote au cours de la sélection artificielle est devenue accessible. Nos travaux de recherche ont largement contribué à ce domaine, en affinant le protocole de sélection et en mettant en évidence une réponse à la sélection due à une évolution des interactions interspécifiques (Blouin et al. 2015; Raynaud et al. 2019, 2022b, a; Jacquiod et al. 2022; Kalachova et al. 2022). Le microbiote associé aux racines des plantes (microbiote rhizosphérique) revêt un intérêt tout particulier de par son importance sur la

<sup>1</sup> ATTENTION : selon l'article 16 de l'arrêté du 25 mai 2016, le total d'encadrants ne peut pas dépasser 2, sauf si l'un des encadrants appartient au monde socio-économique, qui peut venir en sus, ou en cas de co-tutelle; Le décompte des co-encadrements se fera au prorata du nombre d'encadrants : 1 pour 1 encadrant, ½ pour deux encadrants.

croissance des plantes. Parmi les traits végétaux susceptibles de répondre à la sélection de microbiotes rhizosphériques, on compte maintenant la biomasse aérienne de la plante (Swenson et al. 2000), sa date de floraison (Lau and Lennon 2012; Panke-Buisse et al. 2015; Lu et al. 2018) ou un indice de croissance et de santé (Jacquiod et al. 2022).

### **Objectifs et hypothèses**

Un premier objectif de ce projet est de sélectionner des microbiotes rhizosphériques associés à une meilleure résistance du maïs à la sécheresse au cours d'une expérience multigénérationnelle. Pour ce faire, deux approches seront testées. L'une *in vitro*, sélectionnant des communautés microbiennes issues de la rhizosphère en plaque de 96 puits (haut-débit) sur milieu nutritif mimant les exsudats racinaires du maïs et un déficit hydrique grâce à des composés osmotiques. L'autre approche se fera en serre, sur plantes cultivées dans du sol, en sélectionnant les microbiotes rhizosphériques du maïs. Pour chaque génération, nous mesurerons la résistance des plantes au stress hydrique et récupérerons le sol rhizosphérique des plantes les plus résistantes, pour l'inoculer à une nouvelle génération de plante. Par itération, nous obtiendrons des microbiotes de plus en plus performants pour accroître la résistance du maïs à la sécheresse.

Un deuxième objectif consiste à identifier et hiérarchiser les mécanismes morphologiques ou physiologiques impliqués dans l'amélioration de la résistance à la sécheresse par le microbiote rhizosphérique. En particulier, nous testerons quatre hypothèses sur l'effet des microbiotes sélectionnés: (H1) une modification de l'architecture racinaire, (H2) une amélioration de la nutrition, (H3) une production accrue de biofilm au sein de la rhizosphère et/ou (H4) une modification du profil des métabolites rhizosphériques.

### **Description scientifique du projet**

Dans un premier temps, des expérimentations préliminaires auront lieu en plaque de 96 puits, dans une solution dont la composition mimera les exsudats racinaires. Différents niveaux de disponibilité de l'eau seront imposés en manipulant la concentration du milieu en Polyéthylène glycol (PEG), un polymère utilisé pour modifier le potentiel osmotique dans les cultures hydroponiques et mimer un déficit hydrique. Elles permettront de définir une gamme de stress hydrique pour laquelle la sélection de microbiotes peut être efficace, et d'optimiser différents aspects du protocole expérimental. Nous nous baserons également sur des expérimentations de déficit hydrique que nous avons déjà réalisées au laboratoire sur la plateforme 4PMI de l'UMR Agroécologie (<https://plateforme4pmi.dijon.hub.inrae.fr/>), mettant en œuvre du sol, des plantes et des communautés microbiennes complexes (Thiour-Mauprivez et al., 2023). Les communautés les plus efficaces ainsi sélectionnées seront testées en inoculation sur des plants de maïs exposés à un déficit hydrique.

Dans l'expérimentation centrale de la thèse, des plants de maïs (*Zea mays*) seront cultivés pendant 2-3 semaines (selon essais préliminaires), dans un sol sableux (Pré-Velot, Auxonne, Côte d'Or). Un stress hydrique sera appliqué au bout d'une semaine de croissance, et son effet sur la croissance des plantes sera quantifié. Le design expérimental comprendra des plantes bien arrosées (WW), et des plantes stressées (WS) qui seront soumises à deux traitements : un dans lequel les microbiotes associés à une meilleure résistance au stress hydrique seront sélectionnés (WS-S), et un traitement témoin où les microbiotes seront sélectionnés aléatoirement (WS-T). Chaque traitement sera composé de trois lignées de vingt plantes, chaque lignée constituant un évènement de sélection indépendant.

Au terme des 2-3 semaines, la surface foliaire, premier paramètre affecté par le stress hydrique, sera mesuré au planimètre. Pour WS-S, le sol rhizosphérique des trois plantes présentant la surface foliaire la plus élevée sera récupéré pour être inoculé à la génération suivante (Jacquiod et al., 2022). Pour WS-T, les trois microbiotes seront tirés aléatoirement.

Pour le témoin bien arrosé, les plantes seront inoculées avec l'inoculum initial à chaque génération. D'autres paramètres de productivité seront mesurés à chaque génération afin de caractériser l'effet du stress hydrique : (i) la conductance stomatique, indicateur des échanges gazeux foliaires conditionnant la photosynthèse (ii) la fluorescence foliaire, indicateur de l'intégrité du système collecteur de photons, tous deux grâce au Poromètre-fluorimètre Licor Li-600. L'évolution du microbiote rhizosphérique sera analysée en séquençage à haut-débit ciblant les bactéries (16S ARNr) et les champignons (ITS2). Différentes générations seront échantillonnées, le sol rhizosphérique récupéré, puis utilisé pour extraire l'ADN total. L'analyse statistique consistera à détecter une évolution différente de la résistance à la sécheresse selon les traitements, et l'existence d'une corrélation entre la structure du microbiote et les symptômes liés à la sécheresse. A la fin de la 6ème génération, dix plantes prises aléatoirement parmi les 20 de chaque lignée seront analysées pour les paramètres suivants :

(H1) Morphologie racinaire: Les racines sont les premiers organes à percevoir le stress hydrique du sol (Weemstra et al., 2016). La morphologie racinaire répond à ce changement de disponibilité de l'eau, par exemple en augmentant le nombre de racines latérales et en développant un système racinaire plus profond (Orman-Ligeza et al., 2018; Wasaya et al., 2018). Les racines des plantes seront scannées et les images obtenues seront analysées grâce à des logiciels d'analyse dédiées (WinRhizo, Rhizovision...).

(H2) Nutrition : Une disponibilité plus faible en eau dans le sol réduit également la disponibilité en nutriments pour la plante, conduisant à des carences qui peuvent accentuer la diminution de croissance (Prasad et al., 2008 ; Gregory et al., 2012 ; Barzana et al., 2021). Afin de caractériser l'état nutritionnel des plantes, les racines et les parties aériennes seront récoltées et pesées, les tissus broyés et analysés pour leur teneur en carbone et en azote.

(H3) Production de biofilm : Le biofilm est une matrice construite par le microbiote, et assurant un rôle protecteur pour celui-ci, notamment face à la sécheresse (Costa et al., 2018). En particulier, le biofilm produit par les bactéries vivant dans la rhizosphère joue un rôle décisif sur la tolérance à la sécheresse des plantes (Yang et al., 2021). Les microbiotes rhizosphériques seront conservés dans des unités de cryopréservation, et remis en culture pour mesurer l'évolution de leur capacité de production de biofilm *in vitro* via la méthode du Crystal Violet (Jacquiod et al., 2023)

(H4) Profil des métabolites rhizosphériques : L'ensemble des métabolites rhizosphériques joue un dialogue moléculaire entre racines et microbiote qui est crucial au recrutement et à la sélection de ce dernier (Hu et al., 2018 ; Huang et al., 2019). Les métabolites rhizosphériques seront prélevés et caractérisés par LC-MS sur plateforme (IJPB, INRAE Versailles). De plus ils seront quantifiés par analyse colorimétrique et élémentaire (CN).

- Financement du projet – partie Recherche (montants acquis, type de contrat)

(1) Le projet SAMIV (2023-2025, acquis), porteur Manuel Blouin, est financé à hauteur de 40 000 euros par l'appel à projet interne de l'Institut Agro Dijon. Il porte sur la sélection de microbiotes.

(2) Crédit « Nouvel Arrivant » de l'Université de Bourgogne (2024, acquis) octroyé à Samuel Jacquiod dans le cadre de son recrutement et titularisation en tant que MCF. Enveloppe : 6000 euros de fonctionnement.

(3) Demande ANER 2024, projet « BIORHIZEAU » (en attente de réponse). Déposé par Samuel Jacquiod dans le cadre de son recrutement et titularisation en tant que MCF dans l'équipe HOLOBIONTE de l'UMR Agroécologie. Enveloppe : 49900 euros. Crédits pour le recrutement d'un ingénieur d'étude pour soutenir nos expérimentations sur le rôle du microbiote rhizosphérique en condition de déficit hydrique.

(4) Demande du laboratoire Agroécologie a été soumise à la Graduate School Transbio sur l'amélioration de la résistance des plantes à la sécheresse par sélection artificielle de microbiotes (projet Envergure, montant demandé: 67 000 euros de fonctionnement et 81 000 d'équipement, en attente de réponse).

- connaissances et compétences requises

La ou le candidat(e) devra avoir une formation en écologie et évolution. Elle/il devra avoir un intérêt pour l'expérimentation, les méthodes d'analyse des plantes et des communautés microbiennes, ainsi que l'analyse statistique des données. Des compétences en microbiologie, en biologie moléculaire, et en écophysiologie seront appréciées, mais pas indispensables pour réaliser cette thèse.

### **Résumé en français et anglais (limité chacun à 1800 caractères)**

Les biostimulants microbiens pour l'agriculture sont une alternative aux intrants de synthèse qui rencontrent un succès grandissant. Plutôt que de rechercher une souche aux propriétés intéressantes, au sein d'une diversité existante, nous proposons de modifier les propriétés existantes d'un microbiote rhizosphérique, constitué de multiples espèces, par sélection artificielle. En effet, tout comme on améliore les variétés végétales et animales par sélection artificielle en agriculture, il est possible d'en faire de même en ciblant leurs microbiotes. Cette approche novatrice de sélection artificielle de microbiotes pourrait notamment permettre d'améliorer les caractéristiques de plantes avec lesquelles ces microorganismes interagissent. Dans le présent projet, les microbiotes de la rhizosphère seront sélectionnés pour leur capacité à améliorer la résistance du maïs à la sécheresse. Après avoir sélectionné ces microbiotes par passages successifs de ceux associés aux plantes les plus résistantes à la sécheresse à une nouvelle génération de plantes, sur six itérations, nous déterminerons si la résistance à la sécheresse a été améliorée par une modification de l'architecture racinaire, une nutrition azotée améliorée, une production accrue de biofilm au sein de la rhizosphère et/ou une modification du profil des métabolites rhizosphériques. La mise en commun d'expertise en écologie, microbiologie et écophysiologie végétale est particulièrement pertinente et innovante car elle permet d'appréhender la sélection d'un microbiote de manière fonctionnelle. Ces connaissances permettront de révéler quels sont les traits pour lesquels les interactions plantes-microorganismes présentent le plus d'intérêt.

Microbial biostimulants for agriculture are an alternative to synthetic inputs which are becoming very successful. Rather than searching for a strain with interesting properties within the existing diversity, we propose to modify the existing properties of a rhizosphere microbiota, made of multiple species, by artificial selection. Indeed, alike we improved plants and animals with artificial selection in agriculture, it is now feasible to do the same by focusing on their microbiota. This innovative approach of microbiota artificial selection could make it possible to improve the characteristics of plants through the microorganisms it interacts with. In this project, rhizosphere microbiota will be selected for their ability to improve maize resistance to drought. After the selection of efficient microbiota by successive passing those associated with the most drought resistant plants to a new generation of plants, over six iterations, we will determine if drought resistance has been improved by a modification of root architecture, a better nitrogen nutrition, an increased production of biofilm within the rhizosphere and/or a modification of the rhizosphere metabolite profile. The joining of expertise in ecology, microbiology and plant ecophysiology is particularly relevant and innovative because it makes it possible to understand the

selection of a microbiota in a functional way. This knowledge will make it possible to reveal the traits for which plant-microorganism interactions are of most interest.

**Préciser le domaine de compétence dans la liste ci-dessous (2 choix possibles maximum – ne pas modifier les intitulés : ils sont imposés par certains sites web) :**

Agronomie

Ecologie, Environnement

**Mots clés :**

Sélection artificielle ; ingénierie écologique des microbiotes ; interactions plantes-microorganismes ; résistance à la sécheresse ; dynamique éco-évolutive