

TITRE DU PROJET (limité chacun à 255 caractères)

Transmission et héritabilité de l'holobionte chez *Pisum* spp. (TeHoPi)

1) Renseignements administratifs sur la direction de thèse¹ (1 page maximum) :

Directeur de thèse HDR :

Nom : BOUCHENAK-KHELLADI

Prénom : Yanis

Section CNU : 67

Grade : CPJ

HDR : Date de soutenance 01/2023 Discipline : Biologie des organismes : coevolution chez les Angiospermes

L'HDR devra être soutenue, ou sa soutenance autorisée, au moment du dépôt du présent projet.

Coordonnées (adresse, courriel, téléphone) : 06 65 69 10 81, yanis.bouchenak-khelladi@inrae.fr

Unité d'appartenance (intitulé, label, n°, directeur) : UMR Agroécologie 1347, Fabrice MARTIN

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

UMR Agroécologie 1347, Pôle LEGAe, Equipe ECP

17 rue Sully 21000 Dijon

Dr. Yanis BOUCHENAK-KHELLADI

yanis.bouchenak-khelladi@inrae.fr

Transmission et héritabilité de l'holobionte chez *Pisum* spp. (TeHoPi)

Les plantes sont en relation avec divers microorganismes qui peuvent être soit bénéfiques pour la plante en améliorant la croissance, la résistance à des stress abiotiques et biotiques, etc. (Kumar & Verma, 2018) ou alors pathogéniques en causant et dispersant des maladies. Ces microorganismes peuvent être transmis entre générations et peuvent significativement impacter la plante (Johnston-Monje et al., 2016). Ainsi, par pression de sélection, la fitness de la plante serait optimisée si elle sélectionne efficacement son microbiote et le transmet verticalement aux générations suivantes. La transmission verticale se passe lorsque les microbes abrités dans la graine viennent coloniser le sol lors de la germination et, par la suite, potentiellement coloniser les parties internes de la plantule. Ainsi, la graine pourrait être considérée comme un « inoculum » de microbes initial. De nombreuses études ont suggéré la présence d'une transmission verticale du microbiote de la graine entre générations (Ai et al.,

¹ 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.

2023; Chesneau et al., 2022; Darrasse et al., 2007; Johnston-Monje et al., 2016; Özkurt et al., 2020; Rochefort et al., 2021; Walsh et al., 2021).

La transmission du microbiote graine pourrait être caractérisée en trois catégories d'héritabilité : (1) Une transmission de la graine à la graine qui est en cours de germination. Dans ce cas-là, le microbiote n'est transmis qu'au stade de développement le plus précoce de la plante. Certains microbes de graine peuvent aider la graine en améliorant la germination (Rodríguez et al., 2020) ou en sortant la graine de sa phase de dormance (Goggin et al., 2015) ; (2) Une transmission de la graine à la partie endosphérique de la plantule tel que les racines ou la phyllosphère (Abdelfattah et al., 2021) ; (3) Une transmission de graine à graine qui illustre un scénario où la transmission du microbiote boucle un cycle complet d'au moins une génération et pourrait potentiellement être multigénérationnelle.

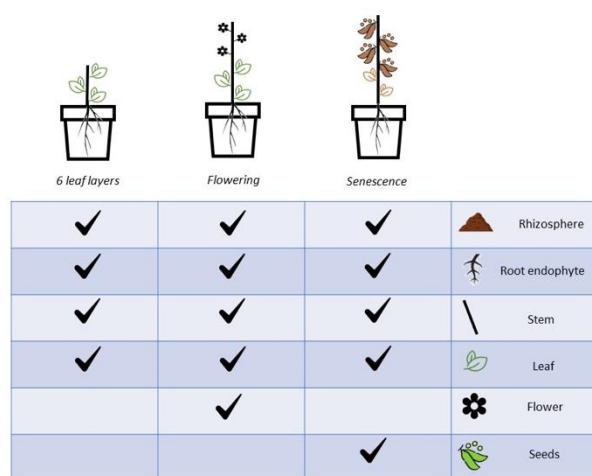
Cependant, la transmission du microbiote de la graine peut être limitée par un facteur important qui est la compétition avec les microbes résidents dans le sol (Nelson, 2004; Vanoverbeke et al., 2016). Étant généralement très abondants (reviewed in Nelson, 2004), les microbes résidents dans le sol peuvent coloniser rapidement la graine par effet de masse (Shmida & Wilson, 1985) et/ou par effet prioritaire (Fukami, 2015). On pourrait donc penser que la communauté rhizosphérique de la plantule va être principalement pilotée par les microbes résidents dans le sol. Cependant, plusieurs études ont montré que les communautés microbiennes de la graine, malgré leur abondance et diversité limitées, peuvent être transmises à la génération suivante et influencer l'établissement du microbiote de la plantule (Johnston-Monje et al., 2016; Moroenyane et al., 2021; Ridout et al., 2019). Par compétition, la présence ou absence de certains genres ou familles de microbes dans le sol pourrait aussi avoir un impact sur la dispersion du microbiote graine, suggérant donc que la structure et la composition des communautés microbiennes du sol soit un autre paramètre à prendre en compte. Une étude a démontré que la présence de sol natif avait un impact positif sur la transmission du microbiote graine (Chandel et al., 2022). Il est possible que le sol hérité de la génération précédente présente encore des microbes bénéfiques en grande abondance ce qui aiderait le développement de la plantule. Dans le cas inverse, un sol hérité pourrait tout autant héberger des pathogènes adaptés à l'espèce de la plante ce qui entraînerait un impact négatif sur la fitness de la plante (Miller et al., 2019).

Le but de ce projet va être de caractériser le degré d'héritabilité du microbiote graine chez *Pisum* ainsi que l'influence des bactéries du sol sur cette héritabilité. Pour cela, le projet sera divisé en deux parties complémentaires. La première partie a été réalisée en serre et se focalise sur la description des communautés bactériennes se trouvant dans les graines sur deux générations ainsi que les communautés rhizosphériques et endophytes de la plantule de la seconde génération. La deuxième partie de ce projet se focalisera sur l'influence des communautés bactériennes du sol sur la transmission verticale du microbiote graine et l'expérience sera réalisée sous conditions *in vitro* où les plantes se développeront dans des chambres de culture.

[Partie 1 - Expérience en serre] L'expérimentation en serre et les prélèvements ont été effectués courant 2025 et viennent de prendre fin. Les échantillons sont en cours de séquençage. Un total de 14 génotypes de *Pisum* a été utilisé pour cette expérience, comprenant trois sous-espèces de *P. sativum* (*P. s. subsp. sativum*, *P. s. subsp. elatius*, *P. s. subsp. abyssinicum*) ainsi que *Pisum fulvum*. L'échantillonnage s'est ensuite déroulé à trois stades de développement de la plante : 6 étages foliaires, floraison et sénescence (Figure 1). Ces stades ont été choisis car les besoins de la plante et les allocations aux ressources de celle-ci peuvent varier durant ces stades avec un potentiel effet sur la structure du microbiote autant rhizosphérique que endosphérique (Figure 1). Pour l'échantillonnage, la rhizosphère a été collectée directement sur les racines avec une spatule afin d'obtenir la quantité nécessaire pour l'extraction d'ADN (250mg). La racine, la tige, les feuilles et les fleurs ont été découpées de la plante avec des ciseaux stériles et leur surface aseptisée. Finalement, les graines matures ont été récoltées et l'ADN du microbiote isolé et extrait suivant un protocole adapté (IRHS-INRAE-Angers). La composition des communautés bactériennes sera évaluée

pour le gène *gyrB* (B subunit of the DNA gyrase), un marqueur moléculaire adéquat pour des assignations taxonomiques.

[Partie 2 - Expérience in vitro] L'expérience in vitro est prévue de commencer dès juin 2027. Ici, nous testerons l'effet qu'exerce l'intensité de compétition du microbiote du sol sur la transmission verticale du microbiote de graine. Ainsi cette intensité de compétition sera subdivisée en deux sous-parties correspondant respectivement à l'abondance (1) et la structure (2) des communautés microbiennes du sol. Pour tester, l'effet d'abondance (1), des graines de pois seront plantées individuellement dans des pots stérilisés en verre d'environ 15 cm de long. Ces tubes seront remplis avec de la terre stérilisée aux rayons gamma avec un inoculum microbien de sol non agricole de la même manière que lors de l'expérience en serre décrits avant. Quatre génotypes de *Pisum* seront testés et les inoculas auront quatre niveaux de dilution (Non dilué, 1/10, 1/100 et 1/1000) donnant donc une matrice de 16 tubes (Figure 2. 1). Les tubes seront ensuite placés en chambre de croissance avec une exposition 'jour' à 20°C pendant 16h suivis par 8h de 'nuit' à 15°C. Une fois que la plante atteint son 6^{ème} étage foliaire, la racine, la tige et les feuilles seront échantillonnées et passeront par la même procédure de stérilisation de surface, d'extraction et de séquençage que pour l'expérience en serre décrits avant. Pour tester l'effet de la structure (2) du microbiome de sol, nos quatre génotypes seront inoculés avec un inoculum de microbiote de sol hérité et génotype-spécifique. Cet inoculum a été obtenu en récoltant le sol de plantes au stade de remplissage des gousses d'une précédente génération. Ce stade avait été retenu car la diversité bactérienne y était la plus diverse en comparaison avec d'autres stade de développement. Ainsi, chaque génotype a permis d'isoler un inoculum hérité génotype-spécifique qui reproduira la diversité microbienne du sol de la plante parentale. Ici nous cherchons à tester si cette structure de communautés spécifique au génotype pourrait avoir un impact sur la transmission verticale du microbiote graine. Ainsi chaque génotype sera inoculé avec un microbiote d'un sol hérité (e.g. A-A, B-B ...) et non hérité (A-B, A-C, B-D ...) (Figure 2.2).



	6 leaf layers	Flowering	Senescence	
✓	✓	✓	✓	Rhizosphere
✓	✓	✓	✓	Root endophyte
✓	✓	✓	✓	Stem
✓	✓	✓		Leaf
		✓		Flower
			✓	Seeds

Figure 1 : Le design d'échantillonnage pour l'expérience en serre. La rhizosphère, la racine, tige et feuilles seront échantillonnées pour les trois stades de développement alors que les fleurs et les graines ne seront échantillonnées que lors du stade de floraison et sénescence respectivement. Avec 14 génotypes testés et 3 répliques par stade et par génotype, nous obtenons un total de 126 pots.

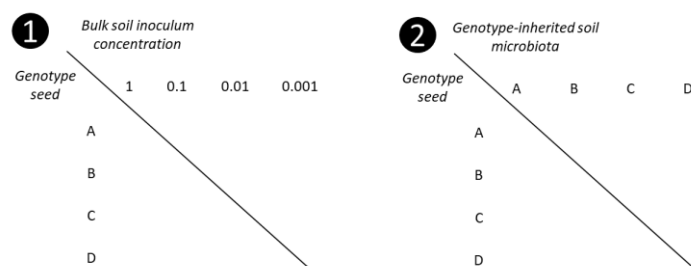


Figure 2 : Expérience in vitro en chambre de croissance. Les graines seront inoculées avec soit (1) un inoculum microbien de sol non agricole à 4 différentes concentrations ou (2) un inoculum microbien de sol hérité et génotype spécifique obtenu lors d'une expérience précédente. Une fois que les plantes atteignent six étages foliaires la racine, la tige et les feuilles seront échantillonnées, leur surface stérilisée.

Le projet est en attente de financement émanant de l'instruction budgétaire 2026 du département BAP de l'INRAE. Une demande de financement ANR 2027 sera également rédigée afin de financer les expérimentations in vitro à partir de juin 2027.

Compétences requises :

- Bonne maîtrise des techniques moléculaires (extraction, quantification et PCR)
- Bonne maîtrise du logiciel d'analyse R
- Connaissances solides des analyses de communautés
- Bonne maîtrise de l'anglais scientifiques
- Rigueur et autonomie expérimentale

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

Ce projet s'intéresse à la transmission verticale du microbiote chez le pois (*Pisum*). Les microbes résidents dans la graine qui, lors de la germination, vont se disperser dans la rhizosphère peuvent potentiellement recoloniser la partie endosphérique de la plantule puis la graine, établissant ainsi une transmission de génération en génération du microbiote. Le degré d'héritabilité de ce microbiote peut varier et dépendre de plusieurs facteurs clés tels que la génétique de la plante, le stade de développement et les conditions abiotiques de culture. Bien que les études sur le sujet se sont multipliées, les modalités de sélection et de transmission du microbiote d'une plante aux générations suivantes restent peu connues. Deux objectifs principaux sont envisagés pour ce projet : (1) Décrire les communautés microbiennes de la graine et leur transfert vertical sur deux générations. Lors de la germination, il est possible que seule une partie des microbes transmis soient résélectionnés par la plantule. Nous allons analyser le microbiote de la graine et le comparer aux communautés microbiennes endosphériques de la plantule à la génération suivante incluant des parties aériennes et racinaires (racine, tige, feuille, fleur et graine). (2) Déterminer l'impact de l'intensité de la compétition entre microbiote du sol et microbiote graine. Un facteur limitant la dispersion des microbes se trouvant dans la graine est la compétition exercée par les microbes résidents du sol. Dans un premier temps, nous cherchons à tester si l'abondance des communautés microbiennes résidentes du sol pourrait impacter la transmission verticale du microbiote graine. Dans un deuxième temps, nous testerons si la communauté microbienne du sol héritée de la génération précédente pourrait aussi impacter le succès de la transmission verticale.

This project focuses on the vertical transmission of the microbiota in peas (*Pisum*). Microbes residing in the seed, which disperse into the rhizosphere during germination, can potentially recolonize the endospheric part of the seedling and then the seed, thus establishing generational transmission of the microbiota. The degree of heritability of this microbiota can vary and depends on several key factors such as plant genetics, developmental stage, and abiotic growing conditions. Although studies on this topic have proliferated, the mechanisms of selection and transmission of the microbiota from a plant to subsequent generations remain poorly understood. Two main objectives are envisioned for this project: (1) To describe the microbial communities in the seed and their vertical transfer over two generations. During germination, it is possible that only a portion of the transmitted microbes are reselected by the seedling. We will analyze the seed microbiota and compare it to the endospheric microbial communities of the next generation seedling, including aerial and root parts (root, stem, leaf, flower, and seed). (2) To determine the impact of the intensity of competition between soil microbiota and seed microbiota. One limiting factor for the dispersal of microbes found in the seed is competition from resident soil microbes. Initially, we will test whether the abundance of resident soil microbial communities could impact the vertical transmission of the seed microbiota. Subsequently, we will test whether the soil microbial community inherited from the previous generation could also impact the success of vertical transmission.

Préciser le domaine de compétence dans la liste ci-dessous :

- Agronomie
- Ecologie, Environnement

Indiquez quelques mots clés concernant votre sujet) : microbiote de la graine, *Pisum spp.*, interactions plantes-microbiote, héritabilité