
EFFET D'UNE CARENCE EN SOUFRE COMBINÉE À UN STRESS HYDRIQUE CHEZ LE POIS PROTÉAGINEUX : ÉTUDE DES MÉCANISMES MOLÉCULAIRES MIS EN JEU DANS LES ORGANES PUIITS ET SOURCE AU COURS DE LA PHASE REPRODUCTIVE

Thèse de **Charlotte HENRIET**¹

Analysée par **Françoise CORBINEAU**²

Co-directrice de thèse : Karine **GALLARDO**, Directeure de Recherche, INRAE Dijon
Co-directrice de thèse : Vanessa **VERNOUD**, Chargée de Recherche, INRAE Dijon

Le travail présenté par Charlotte Henriet a été réalisé dans l'UMR « Agroécologie » de Dijon, au sein de l'équipe « Remplissage des graines et stress abiotiques », sous la codirection de Karine Gallardo (DR INRAE) et de Vanessa Vernoud (CR INRAE). Les objectifs principaux de cette thèse ont été de décrire l'impact d'une interaction entre deux stress abiotiques, un stress hydrique et la carence en soufre au cours de la phase reproductive sur le rendement et la qualité des graines de pois (une plante légumineuse de fort intérêt agronomique et nutritionnel compte-tenu des fortes quantités de protéines stockées dans les graines matures), puis de caractériser au moyen d'approches « omiques » les mécanismes moléculaires sous-jacents en se focalisant sur les graines en cours de développement et les feuilles, sources de nutriments pour les graines. Elle s'est articulée autour de plusieurs aspects : (1) l'analyse phénotypique des plantes de pois soumises à l'un ou l'autre des deux stress ou à leur combinaison, (2) l'analyse de la composition en protéines des graines de pois notamment des protéines de réserve, (3) les analyses omiques (protéomique, transcriptomique, ionomique, métabolomique) offrant pour la première fois une vision globale de la réponse des graines et des feuilles aux simples et double stress.

Cette thèse s'inscrit parfaitement dans le cadre des demandes actuelles, notamment de la France et de l'Union Européenne, visant à augmenter la production de protéines végétales de qualité. Les légumineuses à grosses graines, comme le pois, sont des cibles privilégiées pour atteindre ces objectifs. Cependant leur culture est soumise à de nombreux stress environnementaux en lien avec le changement climatique, tels que les stress abiotiques (température, lumière, eau ...) ou les carences nutritionnelles notamment en termes d'intrants (e.g., soufre). Le manque de marqueurs spécifiques de tels stress est une contrainte majeure pour le développement de nouveaux cultivars mieux adaptés à ces contraintes. Se basant sur des connaissances physiologiques, génétiques, génomiques et protéomiques, les travaux de cette thèse se proposent d'identifier de tels biomarqueurs chez le pois.

Le manuscrit est très clair et parfaitement illustré. Il est structuré en cinq chapitres. Le Chapitre I présente une synthèse bibliographique regroupant les connaissances générales utiles à la compréhension des travaux de thèse. La stratégie d'étude ainsi que les objectifs du projet y sont détaillés. Les trois chapitres suivants, Chapitres II, III et IV, correspondent aux résultats

¹ Thèse de doctorat de l'Université de Bourgogne Franche-Comté présentée et soutenue publiquement le 25 octobre 2019 pour obtenir le grade de Docteur de l'Université de Bourgogne-Franche Comté – Ecole Doctorale Environnement et Santé Spécialité : Sciences agronomiques – Laboratoire d'accueil : UMR Agroécologie, Dijon, France

² Professeur à Sorbonne Université, Membre de l'Académie d'agriculture de France, section 6

produits et analysés au cours de ces travaux de thèse. Ils sont présentés sous forme d'articles scientifiques en anglais. Les approches utilisées ainsi que les principaux résultats sont résumés en français au début de chaque chapitre. Les « Matériels et Méthodes » sont détaillés dans les trois chapitres de résultats. Enfin, le Chapitre V contient une conclusion générale ainsi que des éléments de perspectives pour les travaux réalisés. Le manuscrit est complété de nombreuses références bibliographiques.

L'Introduction générale ou **Synthèse bibliographique** fait le point des connaissances sur la question de la production de protéines végétales de qualité, dans un contexte d'augmentation de la démographie mondiale, de recherche de solutions permettant de rééquilibrer les régimes alimentaires, occidentaux notamment vers la consommation de plus de protéines végétales par rapport aux protéines animales et de la recherche de solutions agronomiques (e.g., agroécologique) permettant de satisfaire cette demande de protéines végétales tout en réduisant l'usage des intrants de synthèse et/ou en exploitant des ressources naturelles non renouvelables. Ainsi, l'Introduction met l'accent sur la culture du pois protéagineux (*Pisum sativum* L.), la légumineuse la plus cultivée en France qui en est le premier producteur européen. En effet, le pois protéagineux produit des graines riches en protéines et sa culture peut être réalisée en absence d'engrais azoté de synthèse grâce à sa capacité d'établir des relations symbiotiques spécifiques avec des bactéries telluriques permettant la réalisation de la fixation symbiotique de l'azote atmosphérique. Malgré de tels avantages nutritionnels, économiques et écologiques, la culture du pois représente moins de 3% des surfaces agricoles en Europe notamment en raison des rendements instables entre années, dus à des stress biotiques (champignons, insectes) et abiotiques (stress hydrique, carences nutritionnelles). L'Introduction présente deux contraintes environnementales majeures affectant la survie de la plante et la productivité des cultures. L'une correspond au stress hydrique, facteur préoccupant dans le contexte de changement climatique actuel. L'autre correspond à un appauvrissement des sols en soufre, un élément nutritionnel essentiel au développement des plantes, dû à la diminution des émissions de dioxyde de soufre qui ne cessent de baisser depuis les années 80 suite à la mise en place des politiques de réduction des rejets industriels dans l'air (raffineries, sites pétrochimiques et installations de combustion).

L'Introduction présente également les données génétiques, génomiques et biochimiques sur le pois et notamment concernant les graines matures de cette plante. Elle fait le point sur nos connaissances actuelles des mécanismes régulant l'accumulation des protéines de réserve (protéines majoritaires de la graine de pois) au cours du développement de ces graines sur la plante mère. En particulier, le développement des graines et la composition en protéines dépendent des ressources mobilisées par la plante à partir des nutriments absorbés au niveau des racines et remobilisés à partir des feuilles, illustrant l'importance cruciale des processus de remobilisation des organes sources (e.g. feuilles) vers les organes puits que sont les graines.

Cette analyse bibliographique conduit l'auteure à énoncer que des stress combinés sont une menace plus probable pour les plantes que les stress individuels, et que de fait il serait plus intéressant aujourd'hui de se concentrer sur la compréhension des réponses des plantes dans des conditions de stress multiples afin de développer des génotypes mieux adaptés aux aléas climatiques en champs. Un aspect particulièrement intéressant et original de l'Introduction générale est l'analyse du rôle de la nutrition soufrée dans la réponse au déficit hydrique chez les plantes. Le soufre joue en effet un rôle de molécule signal dans la fermeture des stomates. Il est de plus à l'origine de la production de métabolites jouant des rôles osmoprotectants. Enfin, le soufre joue un rôle crucial dans les nombreuses réactions de méthylation intervenant chez les plantes (synthèse des polyamines, de vitamines, réparation des protéines endommagées lors du vieillissement, ...).

L'Introduction générale se termine par une présentation des objectifs de la thèse et des démarches expérimentales mises en œuvre. Si des données étaient disponibles concernant l'impact du stress hydrique ou d'une carence en soufre sur le développement des plantes, aucune étude ne s'était intéressée à l'interaction entre ces deux stress et les conséquences qui en découlent. Afin d'obtenir une vision la plus complète possible de l'impact de l'interaction entre ces deux stress, l'étude a été réalisée à différents niveaux en partant de son impact par le phénotypage des plantes entières, jusqu'à la caractérisation des mécanismes moléculaires sous-jacents par l'étude de l'expression des gènes, et de l'accumulation des protéines et de métabolites. L'étude s'est basée sur le couple graines-feuilles pour leur relation organe puits - organe source. Le premier objectif de la thèse visait à étudier l'impact du stress hydrique et d'une carence en soufre appliqués séparément ou combinés sur le rendement et la qualité des graines matures de pois (Chapitre II). Le second objectif visait à identifier les mécanismes moléculaires mis en jeu dans les graines (organes puits de nutriments) au cours des stades précoces de leur développement, et leur modulation en réponse à une carence en soufre et/ou à un stress hydrique (Chapitre III). Le troisième objectif consistait à identifier les mécanismes moléculaires mis en jeu dans les feuilles issues des premiers nœuds reproducteurs (organes sources de nutriments) au cours des stades précoces de la phase reproductive, et leur modulation en réponse à une carence en soufre et/ou à un stress hydrique (Chapitre IV). En parallèle de ce travail, l'auteure de cette thèse a également participé à une étude comparative du transcriptome des feuilles entre le pois (*Pisum sativum* L.) et *Medicago truncatula* (une légumineuse modèle) au cours du processus de remobilisation de l'azote vers les graines.

Le premier chapitre de la partie des Résultats, le Chapitre II, est consacré à l'analyse de la modulation du rendement et de la composition protéique des graines de pois en réponse à une carence en soufre combinée à un stress hydrique. Les principaux résultats obtenus montrent que la combinaison d'une carence en soufre et d'un stress hydrique modéré affecte de manière synergique le rendement ainsi que les composantes de rendement (taille et nombre des graines). De manière très intéressante, ils montrent également que l'abondance relative des protéines de réserve de type globulines 11S dans les graines est beaucoup moins affectée par le stress combiné que par la carence en soufre seule : le stress hydrique atténue en effet l'effet négatif de la carence en soufre sur la composition protéique des graines. Cet effet est probablement dû à la forte diminution de la taille des graines en réponse au stress combiné qui réduit leur demande en azote mais pas en soufre, permettant ainsi l'ajustement du ratio entre les différentes classes de protéines de réserve (en particulier du rapport globulines 7S/globulines 11S). Enfin, l'analyse du transcriptome de graines immatures de pois prélevées à la fin de la période de stress combinés (stade de transition entre l'embryogenèse et l'accumulation des protéines de réserve) a permis de démontrer la mise en place de processus de régulation spécifiques au double stress impliquant un jeu de facteurs de transcription et de SUMO-ligases, enzymes impliquées dans le catabolisme des protéines.

S'agissant des méthodes mises en œuvre, ce chapitre décrit les conditions de culture utilisées et le phénotypage des plantes qui a été réalisé à la Plateforme de Phénotypage Haut Débit de l'UMR « Agroécologie » à Dijon. Sont également décrites les méthodes utilisées en transcriptomique (RNA-seq et RT-qPCR) et protéomique (électrophorèse mono- et bidimensionnelle), ainsi que les mesures des contenus en N, S et C des graines matures de pois. Toutes les données expérimentales ont fait l'objet d'analyses statistiques détaillées.

Le Chapitre III décrit les résultats obtenus lors de l'analyse du protéome des graines de pois de l'embryogenèse au début du remplissage et de l'analyse de l'impact d'une carence en soufre combinée à un stress hydrique. Deux approches ont été mises en place : 1) l'analyse du protéome de graines de pois récoltées à trois stades de développement dans quatre conditions : non limitante en soufre et en eau, carencée en soufre, stress hydrique modéré, combinaison des deux stress ; 2) Utilisation d'une approche réseau pour mettre en évidence les connections entre les différentes protéines, notamment celles régulées par les stress simples et combinés.

Les principaux résultats ont permis l'identification et la quantification de 3184 protéines dans les graines de pois en développement, dont 2723 (85%) sont présentes à au moins deux stades de développement en conditions témoin. L'étude de leur cinétique d'accumulation, de l'embryogenèse jusqu'au début du remplissage, a permis de donner un aperçu de la dynamique du protéome des jeunes graines de pois. Les résultats montrent de plus que la réponse de ces graines aux stress simples ou combinés met en jeu des protéines impliquées dans l'élimination des espèces réactives de l'oxygène ou dans le maintien de l'équilibre redox. Les résultats obtenus montrent enfin que la construction d'un réseau protéique permet de mettre en lumière des connections entre les protéines identifiées par protéomique, donnant un premier aperçu du réseau protéique susceptible de maintenir l'homéostasie redox jusqu'à la phase de remplissage et d'éviter les dommages cellulaires en condition de stress.

En plus des méthodes décrites au Chapitre II, le Chapitre III présente les méthodologies utilisées pour la protéomique à grande échelle hors gel (protéomique shotgun), l'analyse différentielle des données protéomiques par utilisation du paquet Limma R, et la construction d'un réseau de protéines de graines à partir des données issues des 46 échantillons de semences considérés en utilisant un algorithme dynamique d'inférence de réseau implémenté dans R.

En établissant un réseau de protéines de graines, cette thèse a permis de mettre en évidence des protéines antioxydantes qui sont liées entre elles et sont susceptibles de jouer un rôle central pendant le développement des graines. D'autres protéines connectées à ce réseau antioxydant ont été mises en évidence et pourraient jouer un rôle clé dans la modulation de l'état redox des graines en développement précoce, notamment en relation avec la progression du cycle cellulaire. Bien que la relation directe entre les protéines de graines de pois identifiées pour la première fois dans cette étude n'ait pas encore été étudiée, ces données ont fait progresser notre compréhension du réseau redox dans les graines en développement précoce et ouvrent de nombreuses perspectives pour étudier la base moléculaire des interactions révélées. De plus, les travaux ont suggéré que d'importantes modifications post-traductionnelles des protéines des graines (par exemple, la formation de ponts disulfures, la carbonylation, l'oxydation de la méthionine) se produisent pendant le développement précoce des graines et en réponse aux stress qui pourraient faire l'objet de travaux futurs.

Le **Chapitre IV** est consacré à une étude multi-omique des feuilles de pois soumises à une carence en soufre combinée à un stress hydrique au cours des stades précoces de la phase reproductive. Cette approche a mis en œuvre des mesures phénotypiques à cinq stades précoces de la phase reproductive chez le pois cultivé dans quatre conditions : non limitante en soufre et en eau, carencée en soufre, stress hydrique modéré, combinaison des stress. Sont également mises en œuvre des mesures physiologiques à ces cinq stades sur les dernières feuilles formées et sur les feuilles des deux premiers noeuds reproducteurs (teneur en chlorophylle et conductance stomatique), et une analyse multi-omique (transcriptome, protéome, métabolome, et ionome) des feuilles des deux premiers noeuds reproducteurs aux cinq stades précoces de la phase reproductive, et étude de l'effet des stress simples et combinés.

Cette étude intégrative fournit pour la première fois une vue globale des processus physiologiques et moléculaires sous-jacents à la réponse des feuilles de pois à la carence en soufre et au stress hydrique. Les principaux résultats obtenus montrent que les stress simples et combinés affectent le développement des feuilles ainsi que leurs caractéristiques physiologiques (potentiel osmotique, teneur en chlorophylle et conductance stomatique) qui varient en réponse à une carence en soufre et au double stress. Ils montrent de plus que le double stress induit une accumulation de métaux dans les feuilles aux derniers stades de développement étudiés. Ces métaux sont susceptibles d'augmenter la sensibilité du pois au

double stress, et d'expliquer pourquoi un double stress prolongé conduit à la nécrose des feuilles. Ils illustrent la manifestation d'une reprogrammation transcriptionnelle en réponse au double stress dans les feuilles aux stades étudiés. Cette reprogrammation fait intervenir des gènes impliqués dans les processus de modifications post-traductionnelles et de transport des protéines. Les résultats montrent enfin que les changements dans le protéome des feuilles ont lieu à la fin du double stress, mettant en lumière des protéines qui jouent un rôle clé dans les processus de détoxification, notamment liés à l'accumulation des métaux.

En plus des méthodes précédemment évoquées, ce chapitre décrit la mise en place d'analyses quantitatives des phytohormones et de différents métabolites (acides aminés, acides organiques, sucres).

Le **Chapitre V** présente les conclusions générales et les perspectives de la thèse. Les résultats obtenus ont permis d'enrichir pour la première fois notre compréhension de l'interaction entre deux stress anciennement caractérisés, à savoir une carence en soufre et un stress hydrique lors des stades précoces de la phase reproductive sur la productivité et la qualité des graines de pois. Ils permettent également de caractériser finement des réponses moléculaires associées à ces stress au sein des feuilles et des graines en développement. Les perspectives de ce travail de thèse sont précieuses et permettront de rechercher des mutants (TILLING) pour les gènes cibles révélés et les protéines susceptibles de jouer un rôle dans la tolérance du pois aux stress et de les tester en expérimentation. Comme l'objectif est d'améliorer et de stabiliser le rendement et la qualité des graines de pois, des allèles favorables des gènes candidats pourront être recherchés et introgressés dans des fonds agronomiques performants.

En **conclusion**, les travaux présentés sont très originaux et conséquents. Ils ont été, à juste titre, très bien valorisés. L'auteur fait preuve d'une excellente capacité analytique combinant différentes approches, physiologiques, phénotypiques, omiques couplées à des analyses statistiques rigoureuses. L'intégration des données pour la construction d'un réseau de gènes et protéines est une illustration remarquable d'une approche de génomique des systèmes basée sur le langage R aujourd'hui développées par les statisticiens pour l'exploitation de diverses données quantitatives à grande échelle. Le document expose de façon très claire une démarche pertinente visant à apporter des données précieuses ainsi qu'une réflexion sur la stratégie d'évaluation de l'impact de stress environnementaux sur la composition des graines. L'apport en connaissances fondamentales est très conséquent révélant des applications importantes en sélection variétale. La mise en œuvre des expérimentations montre un large éventail de techniques parfaitement maîtrisées par l'auteure incluant les techniques de culture et de phénotypage des plantes et des techniques omiques de pointe.

De manière remarquable, les résultats ont mis en évidence un effet atténué de la carence en soufre combinée au stress hydrique tant sur le phénotype des plantes que sur le transcriptome et le protéome comparé à une carence en soufre seule. Ces nouvelles connaissances ont permis l'identification de protéines candidates susceptibles de contrôler les mécanismes de développement des graines ou la détoxification des cellules lors des stress abiotiques étudiés. Ils offrent des perspectives d'amélioration et de stabilisation des rendements et de la qualité nutritionnelle des graines chez le pois.

L'excellence de ces travaux de thèse justifie pleinement la mise sur le site de ce document d'analyse, à titre de valorisation.

Articles publiés :

Henriet C, Aimé D, Térézol M, Kilandamoko A, Rossin N, Combes-Soia L, Labas V, Serre RF, Prudent M, Kreplak J, Vernoud V and Gallardo K (2019). Combining water stress with sulfur

deficiency in pea impedes reproductive development but reduces imbalance in seed protein composition. J Exp Bot. 70: 4287-4304. doi: 10.1093/jxb/erz114.

Gallardo K, Besson A, Klein A, Le Signor C, Aubert G, **Henriet C**, Térézol M, Pateyron S, Sanchez M, Trouverie J, Avice JC, Larmure A, Salon C, Balzergue S, Burstin J (2019) Transcriptional Reprogramming of Pea Leaves at Early Reproductive Stages. Front Plant Sci. 10:1014. doi: 10.3389/fpls.2019.01014.

Devenir du Docteur

Charlotte **Henriet** vient d'être recrutée comme "Lab Leader" chez Bayer CropScience (site de Méréville)