

IDENTIFICATION DES MÉCANISMES DE DÉFENSES DANS LES GRAINES DORMANTES DE TOMATE

Thèse de doctorat de : Benjamin **HUBERT**¹

Analysée par : Noëlle **DORION**²

Directrice de thèse : Julia **BUITINK**, Directrice de recherche INRAE, IRHS-SEED

Co-directeur(s) de thèse : Olivier **LEPRINCE**, Professeur Institut Agro Rennes
Angers, IRHS-SEED

Depuis la naissance de l'agriculture, la graine est indéfectiblement liée à l'homme. Et ceci d'autant plus que nous sommes face à l'augmentation constante de la population humaine et aux conséquences du changement climatique. Dans ce contexte, la recherche d'une qualité maximum pour les graines en termes d'homogénéité à la levée, de vigueur, de qualité génétique, d'état sanitaire, *etc.* est un impératif pour la sécurité alimentaire.

La tomate (*Lycopersicum esculentum*) a été choisie comme modèle d'étude, d'une part à cause de son intérêt économique majeur dans le monde, et d'autre part pour sa sensibilité à divers stress biotiques et abiotiques qui peuvent entraîner des pertes de rendement en fruits de 20 à 70%. Certains des agents pathogènes impliqués sont transmis par les graines, et la protection sanitaire de celles-ci nécessitent l'enrobage par des produits issus de l'agrochimie. Cette thèse s'inscrit dans un contexte de réduction des intrants phytosanitaires et de recherches de méthodes alternatives dans le cadre d'un projet PPR-ANR SUCSEED.

Or, il doit exister des défenses naturelles dans les graines, puisqu'elles se conservent à l'état dormant dans les conditions naturelles. Ainsi, l'élicitation de ces défenses pourrait être une des méthodes envisagées pour réduire l'utilisation de produits phytosanitaires.

Cette thèse s'inscrit dans une étape préliminaire qui consiste à mettre en évidence des mécanismes de défenses constitutives dans les graines de tomate dormantes et à les identifier.

Le travail de l'auteur, s'organise en huit chapitres, dont deux ont fait l'objet de publications scientifiques dans *Journal of experimental botany* et *Plant. Methods*.

¹ Thèse de doctorat préparée à l'Institut National d'Enseignement Supérieur pour l'Agriculture, l'Alimentation et l'Environnement, au sein de l'Ecole doctorale n°642, Végétal, Animal, Aliments, Mer, Environnement ; spécialité biologie et physiologie végétales. UMR, Institut de Recherche en Horticulture et Semences (IRHS) ; présentée et soutenue à Angers, le 11 décembre 2024. Thèse N° C-180 2024-24.

² Membre émérite de l'Académie d'agriculture de France, Section 1 « Productions végétales ».

Le chapitre I présente une synthèse bibliographique très complète des connaissances concernant les mécanismes de dormance et de germination des graines et de leur régulation hormonale et moléculaire d'une part, et des modalités de défense des plantes et des graines face aux agents pathogènes fongiques principalement. Ce chapitre complexe est heureusement très bien illustré.

Le chapitre VIII, Matériels et méthodes, est reporté en fin de manuscrit, permettant l'exposé direct des résultats.

Le chapitre II fait l'objet de la publication dans *Journal of experimental botany* intitulée : **Sleeping but not defenceless: seed dormancy and protection**. Il s'agit d'une revue de littérature prolongeant le chapitre I, dans laquelle l'auteur arrive à la conclusion que les graines dormantes sont dotées de défenses distribuées dans les différents compartiments, particulièrement dans le tégument, qui est à la fois une barrière physique et une barrière biochimique. Ces composés de défenses, dont des protéines PR, sont libérés lors de l'imbibition, mais peuvent aussi être synthétisés à nouveau, en particulier lors d'une dormance secondaire, prolongeant ainsi la protection lors d'une re-imbibition.

Le chapitre III fait l'objet de la publication dans *Plant Methods* intitulée : **A method to determine antifungal activity in seed exudates by nephelometry**. Ce chapitre décrit l'utilisation de la néphélométrie pour détecter et quantifier l'activité antifongique (AFA), dans les exsudats des graines de tomate durant l'imbibition. Les essais ont été réalisés contre deux espèces d'*Alternaria brassicicola* non-hôte et *Alternaria alternata* pathogène spécifique de la tomate. L'activité AFA dépend du stade de développement, de la graine dormante jusqu'à la plantule. Il dépend aussi du génotype testé, ce qui doit être gardé en mémoire en vue d'une éventuelle application agronomique. Cependant, l'auteur montre aussi que cette activité antifongique est sans effet sur *A. alternata* un champignon hôte de la tomate. Ce qui complique, il me semble, la recherche de méthodes alternatives aux traitements des semences de tomate.

Le chapitre IV identifie l'origine des AFA dans les graines dormantes par des méthodes de néphélométrie. L'auteur a montré que, lors de l'imbibition, les graines dormantes libèrent un large éventail de protéines constituant une première ligne de défense protectrice et durable dans le sol avant contact avec l'agent pathogène. L'exploitation de la diversité génétique des protéomes de l'exsudat a permis de démontrer que les mécanismes à l'origine des défenses des graines sont spécifiques et complexes, impliquant de nombreux acteurs protéiques. Parmi ces protéines, il a identifié de nombreuses protéines PR. En comparant les protéomes de cinq génotypes, il a pu associer un groupe de protéines avec le génotype qui inhibe le plus *A. brassicicola* (Ab43). Il faut noter que l'environnement n'influence que secondairement les résultats.

Le chapitre V essaie de déterminer si un programme de défense spécifique aux tissus est activé au niveau transcriptionnel et protéomique lors de l'imbibition des graines dormantes. Dans cette étude fondée notamment sur la dissection de graines, l'auteur montre que les

albumens dormants sont la principale source d'AFA contre *Alternaria brassicicola* (Ab43). Les analyses protéomiques des exsudats correspondants révèlent un enrichissement significatif en protéines de défense qui coïncident avec les activités antifongiques testées. Parmi celles-ci, les protéines PR-5 et PR-10 sont aussi spécifiques de la dormance. L'auteur considère, de ce fait, que ces protéines de défenses pourraient faire de bons marqueurs moléculaires reliant défense et dormance.

Le chapitre VI est le dernier chapitre expérimental. L'auteur réalise une étude comparative des programmes de défense des graines dormantes et des plantules. L'idée étant de compléter des résultats mentionnés au chapitre III, dans lequel les exsudats des graines non dormantes et des plantules avaient des AFA supérieures aux graines dormantes.

Par rapport aux exsudats de graines dormantes, l'AFA plus élevée des exsudats de plantules s'accompagne d'un enrichissement significatif en protéines de défense (PR-2), (PR-3), (PR-6), (PR-7), (PR-9), (PR-10 like), (PR-12), (PR-14). Certaines de ces PR sont aussi spécifiques de la phase de dormance, ainsi (PR-10 like) est commune aux protéomes des exsudats de plantules et d'albumens dormants, renforçant l'hypothèse de marqueur du lien défense/dormance.

Le chapitre VII est consacré à une discussion générale dans laquelle l'auteur rappelle ses principaux résultats et leurs limites. Il rappelle que ces travaux avaient pour objectif de déterminer si les graines dormantes activent un programme de défense constitutif durant l'imbibition, impliquant des molécules défensives et les gènes qui les régulent. En effet, c'est bien ce qu'il a montré. En particulier ses AFA sont efficaces dans des défenses généralistes démontrées ici contre une espèce d'*Alternaria* non-hôte. Nous retiendrons aussi, en vue d'éventuelles applications agronomiques, que ces défenses varient en fonction du génotype et du stade de développement de la graine. L'auteur indique que « ensemble, ces résultats constituent une première base pour comprendre comment les graines se défendent durant la dormance et ouvrent de nouvelles perspectives afin d'investiguer ce champ de recherche encore inexploré ». On peut comprendre qu'étant donné la complexité des résultats obtenus, l'auteur se soit arrêté à cette prudente conclusion. Toutefois, j'aurai aimé avoir l'avis de l'auteur sur l'objectif agronomique affiché au début du mémoire : utiliser l'éllicitation des défenses naturelles pour réduire l'utilisation de produits phytosanitaires ; quitte à en souligner les difficultés mises au jour dans cette thèse par un ensemble très conséquent de résultats expérimentaux.

En dépit de cette petite remarque, il est clair que les résultats originaux de ces travaux de recherche s'inscrivent pleinement dans le champ d'intérêt de l'Académie d'agriculture de France et justifient la valorisation de cette thèse par la présentation de son analyse sur le Site et dans le Mensuel de l'Académie.