

Lyon 1 INRAE



VetAgro Sup



écologie
microbienne
Lyon



Centre d'Etude des Substances Naturelles



Métabolomique des plantes : des perspectives ?

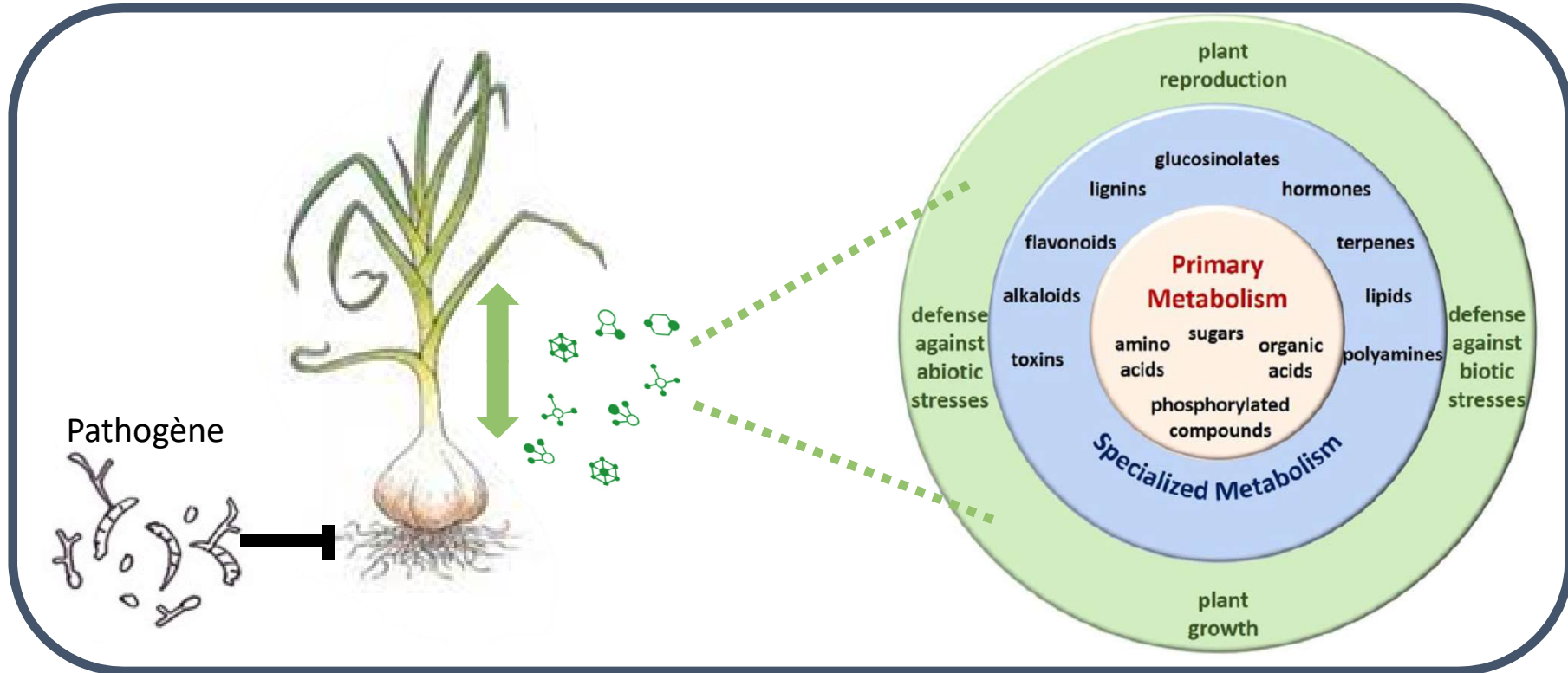
C. PRIGENT-COMBARET DR CNRS

M. REY IE CNRS

Ecologie Microbienne, Univ. Claude Bernard Lyon1



Le métabolisme spécialisé des plantes



Lorsque les plantes se défendent contre l'attaque de pathogènes des modifications majeures de leur **métabolisme spécialisé** ou **secondaire** (phytoalexines, acide hydroxycinnamique, etc) sont observées.

Métabolisme spécialisé et fusariose de l'ail

L'ail (*Allium sativum*)

- Culture à forte valeur ajoutée
- Enjeux économiques majeurs pour les exploitants

La fusariose de l'ail (*Fusarium proliferatum*)

- Apparition tardive des symptômes : au stockage sans apparition de signes distinctifs de maladie au champ tout au long de la culture
- Jusqu'à 80% de pertes sur certains lots (Chrétien *et al.*, 2020)



Métabolisme spécialisé et fusariose de l'ail

L'ail (*Allium sativum*)

- Culture à forte valeur ajoutée
- Enjeux économiques majeurs pour les exploitants

La fusariose de l'ail (*Fusarium proliferatum*)

- Apparition tardive des symptômes : au stockage sans apparition de signes distinctifs de maladie au champ tout au long de la culture
- Jusqu'à 80% de pertes sur certains lots (Chrétien *et al.*, 2020)



Peut-on identifier des métabolites végétaux pouvant servir de marqueurs de fusariose à des stades précoces de croissance des aulx?

Métabolisme spécialisé et fusariose de l'ail

L'ail (*Allium sativum*)

- Culture à forte valeur ajoutée
- Enjeux économiques majeurs pour les exploitants

La fusariose de l'ail (*Fusarium proliferatum*)

- Apparition tardive des symptômes : au stockage sans apparition de signes distinctifs de maladie au champ tout au long de la culture
- Jusqu'à 80% de pertes sur certains lots (Chrétien *et al.*, 2020)



Peut-on identifier des métabolites végétaux pouvant servir de marqueurs de fusariose à des stades précoces de croissance des aulx?



Hypothèse: Métabolome de l'ail serait modifié en présence de *F. proliferatum*, y compris dans sa forme non-symptomatique

Métabolisme spécialisé et fusariose de l'ail

L'ail (*Allium sativum*)

- Culture à forte valeur ajoutée
- Enjeux économiques majeurs pour les exploitants

La fusariose de l'ail (*Fusarium proliferatum*)

- Apparition tardive des symptômes : au stockage sans apparition de signes distinctifs de maladie au champ tout au long de la culture
- Jusqu'à 80% de pertes sur certains lots (Chrétien *et al.*, 2020)



Peut-on identifier des métabolites végétaux pouvant servir de marqueurs de fusariose à des stades précoces de croissance des aulx?



Hypothèse: Métabolome de l'ail serait modifié en présence de *F. proliferatum*, y compris dans sa forme non-symptomatique



Axe 2 – Tâche 2-1



Objectif: Caractérisation du métabolome de l'ail dans les essais du projet Synergies

- en conditions contrôlées
- au champ où l'effet suppressif de composts a été évalué

Démarche expérimentale

Modalités comparées

1



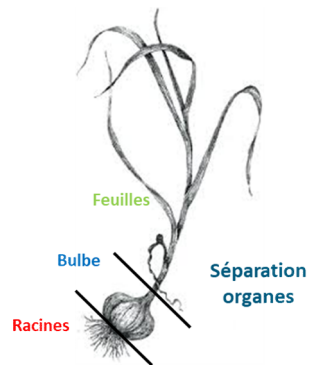
2



3



Préparation des échantillons



Feuilles
(n=15)



Bulbes
(n=15)



Racines
(n=15)

+ Lyophilisation
broyage

Extraction méthanol

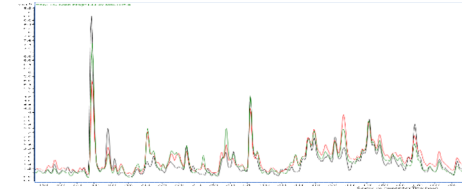


LC-DAD-QTOF (Modes +/-)



- Phases mobiles : eau et acétonitrile (polarité)
- Phase stationnaire : colonne silice greffée C18

Métabolomique non ciblée



Comparaison de profils

Traitement des données avec

4
 W_m

= intensité ions à un temps
de rétention donné



- Analyses statistiques **multivariées** non supervisées (**ACP**) et supervisées (**PLS-DA**)
- Identification par rapport aux bases de données (locales, bibliographie, données MS/MS)

Tests de pathogénicité en conditions contrôlées (CTIFL Balandran)

2020



MODALITES TESTEES (pour Analyses de Métabolomique)

- | | |
|----|---|
| C | Sol non-stérile non-infecté par <i>F. proliferatum</i> |
| C1 | Sol non-stérile infecté avec 5 g de graines d'orge inoculé/L |
| C2 | Sol non-stérile infecté avec 20 g de graines d'orge inoculé/L |

Conditions expérimentales

- *F. proliferatum*, souche G45-1-2/1.
- Inoculation : graines d'orge inoculées avec *F. proliferatum*
- Variété : **Edenrose**
- Sol prélevé en parcelle AB
- Essais sous tunnel (5 blocs x3 plantes /modalités)



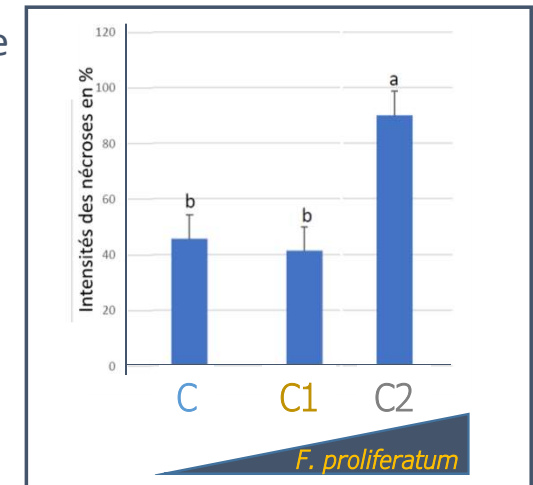
Echantillonnage:

- Au stade 6 feuilles pour les analyses du métabolome dans les compartiments feuilles, bulbes, racines
- Au CTIFL: suivi de la croissance, de l'état sanitaire des plantes et après récolte stockage des aulx pour analyse des symptômes

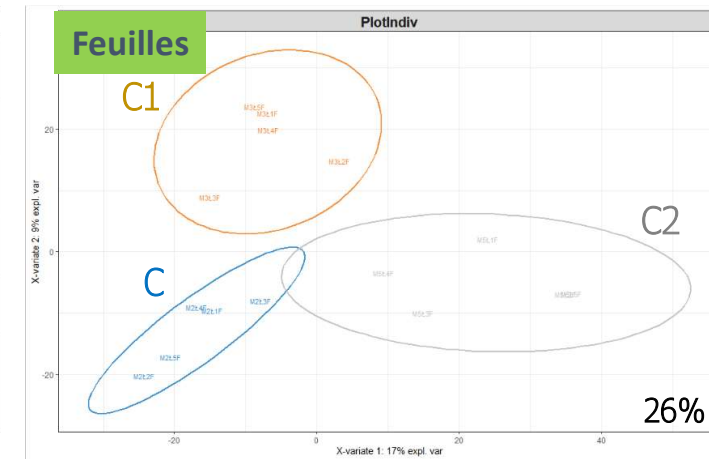
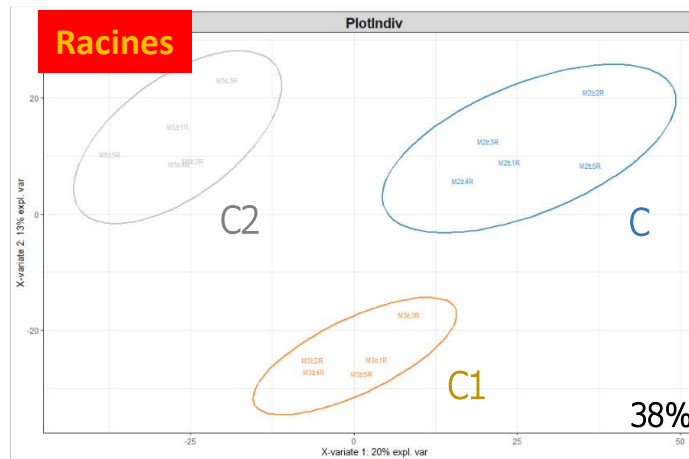
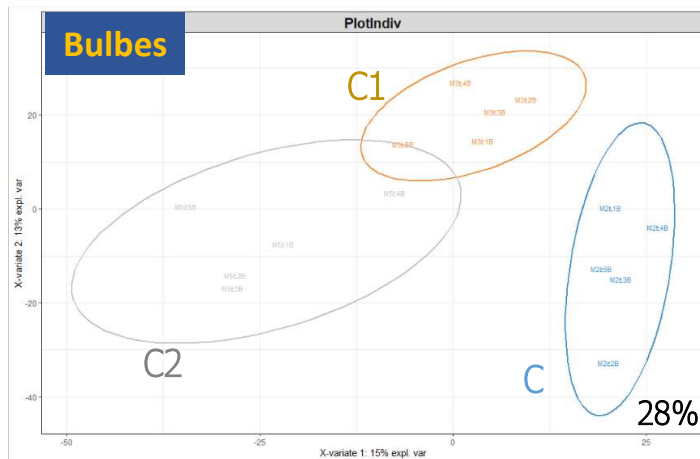
Recherche de marqueurs précoces de fusariose de l'ail



Niveau de maladie après stockage:



Comparaison des profils métaboliques dans les différents tissus (PLS-DA)





→ Séparation nette des métabolomes en fonction de la **taille de l'inoculum** dans tous les tissus

Recherche de marqueurs précoces de fusariose de l'ail

➤ Identification des 20 ions ("composés") impliqués dans la séparation des métabolomes dans les différents tissus



Ions	Racines	Bulbes	Feuilles
3	x	x	x
4	x		x
8	x	x	
9	x	x	
15	x	x	
21		x	x
22		x	x
1	x		
7	x		
10	x		
11	x		
12	x		
13	x		
17	x		
5		x	
6		x	
2		x	
14		x	
16		x	
18		x	
20		x	
19			x

	Plus abondant en C2 (=20g d'orge inoculé) vs C (non-inoculé)
	Moins abondant en C2 (=20g d'orge inoculé) vs C (non-inoculé)

Recherche de marqueurs précoces de fusariose de l'ail

➤ Identification des 20 ions ("composés") impliqués dans la séparation des métabolomes dans les différents tissus

Ions	Racines	Bulbes	Feuilles
3	x	x	x
4	x		x
8	x	x	
9	x	x	
15	x	x	
21		x	x
22		x	x
1	x		
7	x		
10	x		
11	x		
12	x		
13	x		
17	x		
5		x	
6		x	
2		x	
14		x	
16		x	
18		x	
20		x	
19			x

	Plus abondant en C2 (=20g d'orge inoculé) vs C (non-inoculé)
	Moins abondant en C2 (=20g d'orge inoculé) vs C (non-inoculé)

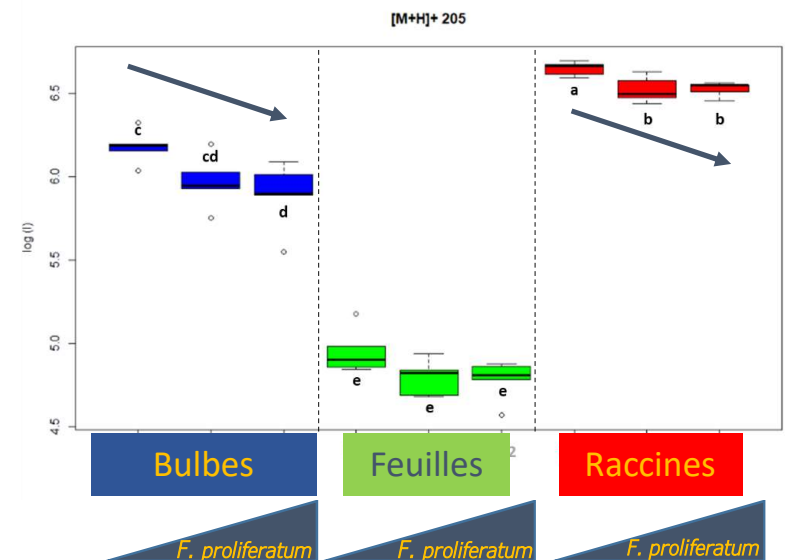
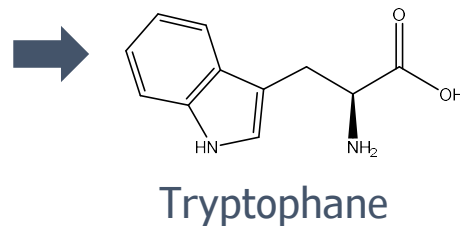


Malheureusement, seul un petit nombre de ces composés ont pu être annotés (peu de données disponibles dans les bases de données).

Recherche de marqueurs précoces de fusariose de l'ail

➤ Identification des 20 ions ("composés") impliqués dans la séparation des métabolomes dans les différents tissus

Ions	Racines	Bulbes	Feuilles
3	x	x	x
4	x		x
8	x	x	
9	x	x	
15	x	x	
21		x	x
22		x	x
1	x		
7	x		
10	x		
11	x		
12	x		
13	x		
17	x		
5		x	
6		x	
2		x	
14		x	
16		x	
18		x	
20		x	
19			x

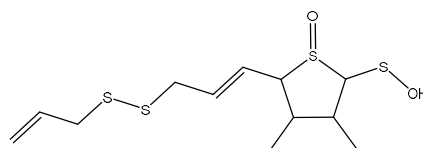


- ➔ Réduction de la teneur en **tryptophane** dans les plantes infectées (bulbes et racines)
- ➔ " Effet puits " dû à la croissance du champignon ?
- ➔ Le métabolisme du tryptophane est connu comme impliqué dans la **régulation des réponse de défense** des plantes. Il est souvent associé à la dysbiose du microbiote.

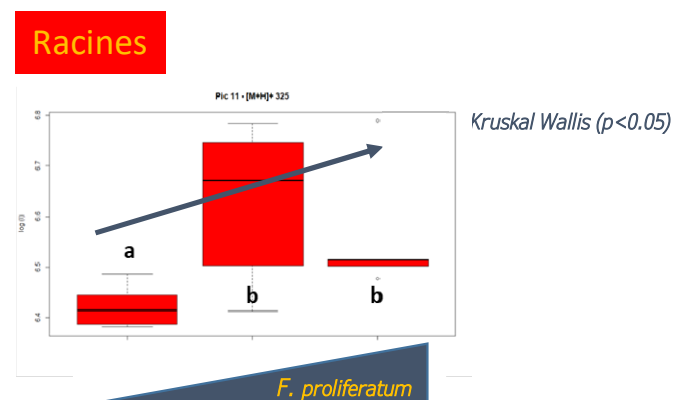
Recherche de marqueurs précoces de fusariose de l'ail

➤ Identification des 20 ions ("composés") impliqués dans la séparation des métabolomes dans les différents tissus

Ions	Racines	Bulbes	Feuilles
3	x	x	x
4	x		x
8	x	x	
9	x	x	
15	x	x	
21		x	x
22		x	x
1	x		
7	x		
10	x		
11	x		
12	x		
13	x		
17	x		
5		x	
6		x	
2		x	
14		x	
16		x	
18		x	
20		x	
19			x



Garlicnine A

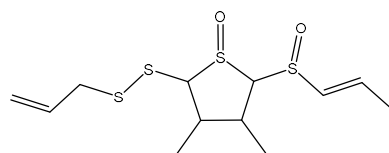


➔ Augmentation de la teneur en **Garlicnine A** dans les plantes infectées (racines)

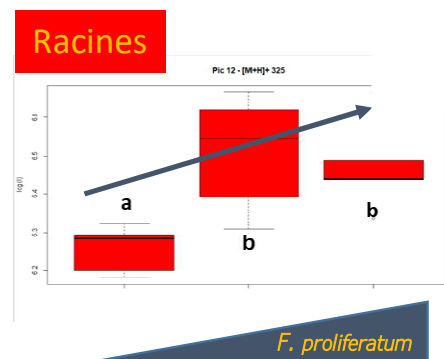
Recherche de marqueurs précoces de fusariose de l'ail

➤ Identification des 20 ions ("composés") impliqués dans la séparation des métabolomes dans les différents tissus

Ions	Racines	Bulbes	Feuilles
3	x	x	x
4	x		x
8	x	x	
9	x	x	
15	x	x	
21		x	x
22		x	x
1	x		
7	x		
10	x		
11	x		
12	x		
13	x		
17	x		
5		x	
6		x	
2		x	
14		x	
16		x	
18		x	
20		x	
19			x



Garlicnine C

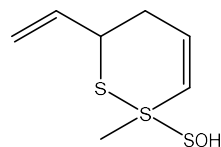


➔ Augmentation de la teneur en **Garlicnine A et C** dans les plantes infectées (racines)

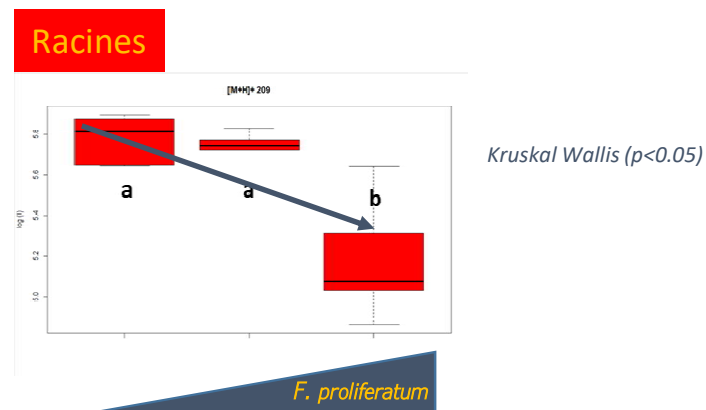
Recherche de marqueurs précoces de fusariose de l'ail

➤ Identification des 20 ions ("composés") impliqués dans la séparation des métabolomes dans les différents tissus

Ions	Racines	Bulbes	Feuilles
3	x	x	x
4	x		x
8	x	x	
9	x	x	
15	x	x	
21		x	x
22		x	x
1	x		
7	x		
10	x		
11	x		
12	x		
13	x		
17	x		
5		x	
6		x	
2		x	
14		x	
16		x	
18		x	
20		x	
19			x



Garlicine D



- ➔ Augmentation de la teneur en **Garlicine A et C** dans les plantes infectées (racines)
- ➔ Diminution de la teneur en **Garlicine D** dans les plantes infectées (racines)
- ➔ Composés organosulfurés de la voie de l'alicine, aux propriétés antimicrobiennes
- ➔ Marqueurs de l'état de santé des alliums ?

Analyses métabolomiques sur les échantillons des essais au champ

Essai 1 (2020)

Localisation: Drôme (SERAIL, CA26)

Variété: Flavor

Composts : I1 (industrie agroalimentaire), D (déchets verts) et B (déchets verts et fumier dinde)

Résultat: pas d'effets suppressifs des composts

Essai 2 (2021)

Localisation: Drôme (SERAIL, CA26)

Variété: Clédor

Composts : A2 (déchets verts) et H (marc de café, pulpe olive, raisin etc)

Résultat: le compost A2 limiterait légèrement la fusariose

2 temps d'échantillonnage

- Précoces= 6 Feuilles
- Tardifs = après stockage

Analyse sur stade 6 Feuilles uniquement

Même protocole d'analyses métabolomiques

Analyse sur stade 6 feuilles et après stockage post-récolte

Deux types d'exploitation des résultats

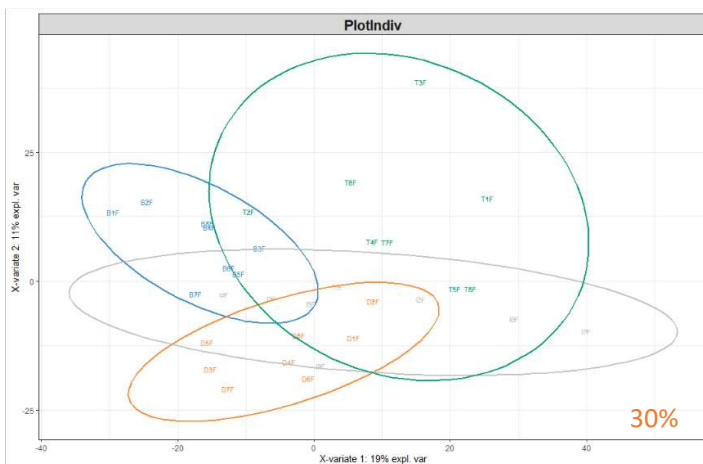
- Comparaison des profils métaboliques en fonction des conditions composts
- Analyse ciblée sur des marqueurs précédemment identifiés

Comparaison des profils métaboliques des aulx

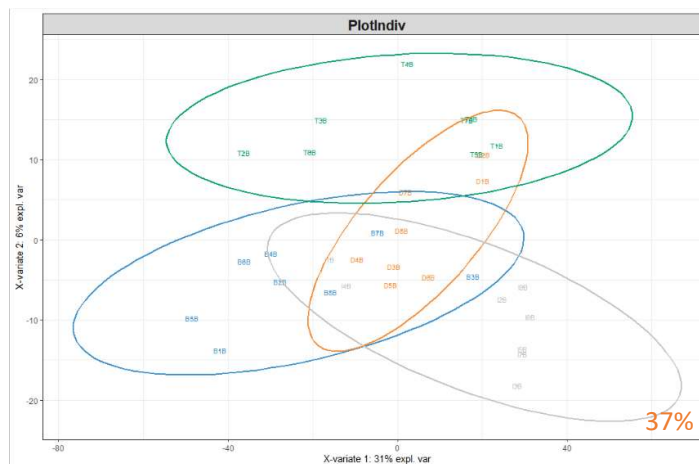
Essai 1 (2020) – Stade 6 feuilles

Légende:

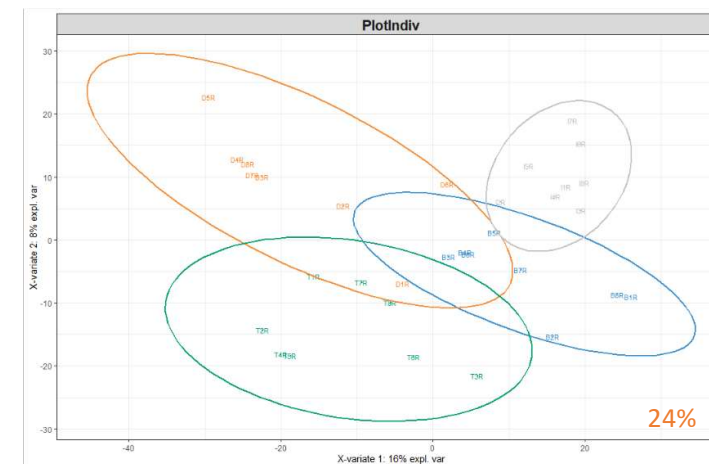
Compost B
Compost D
Compost I
Contrôle non amendé



PLS-DA / Feuilles



PLS-DA / Bulbes



PLS-DA / Racines

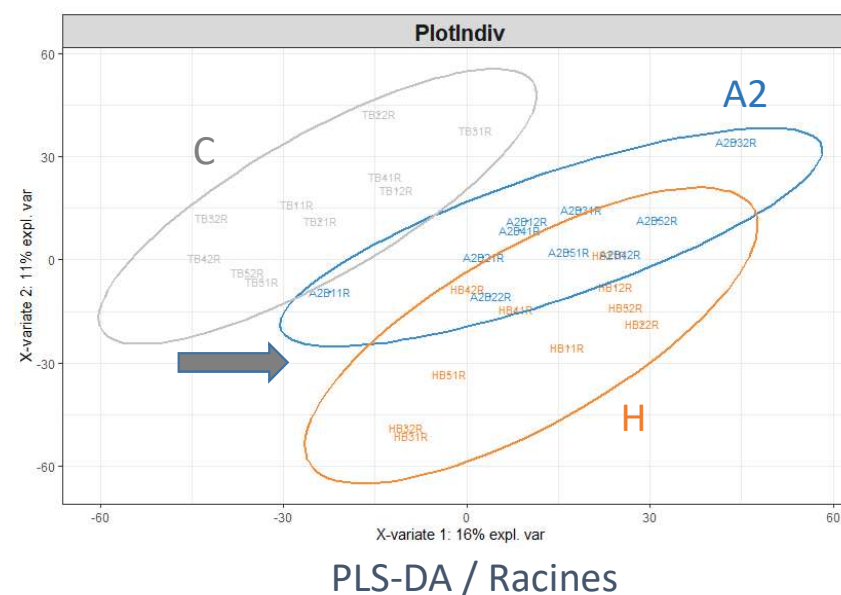
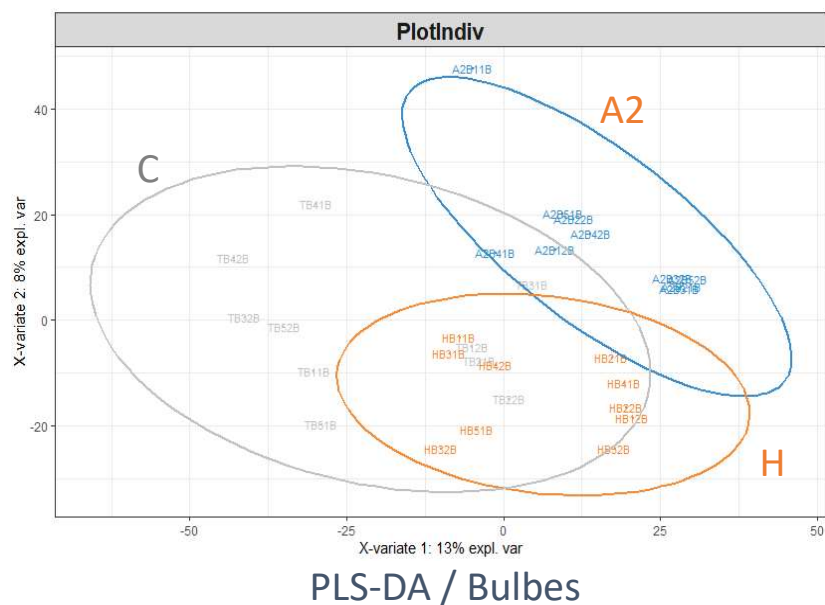
➔ Pas de séparation nette des profils métaboliques en fonction des traitements

Comparaison des profils métaboliques des aulx

Essai 2 (2021) – Stade 6 feuilles

Légende:

Compost A2
Compost H
Contrôle non amendé



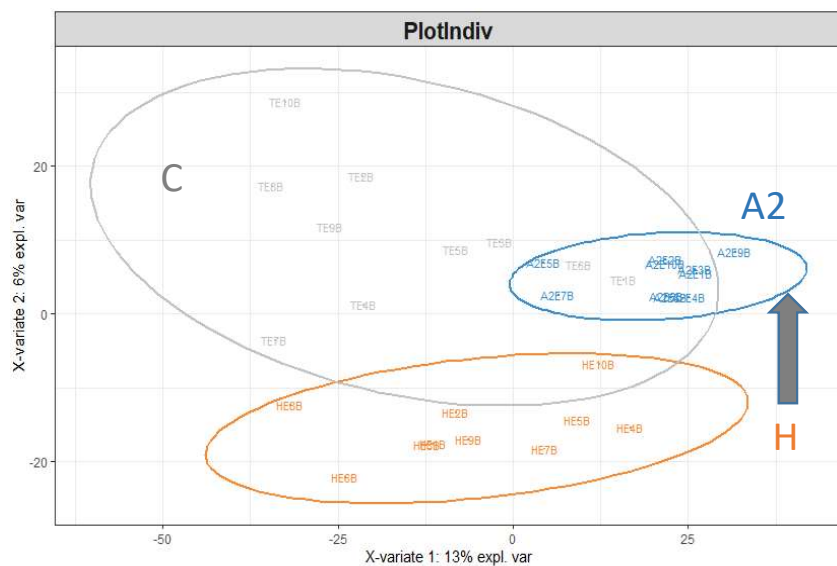
➔ On observe une séparation entre les traitements composts vs le contrôle non amendé pour les racines

Comparaison des profils métaboliques des aulx

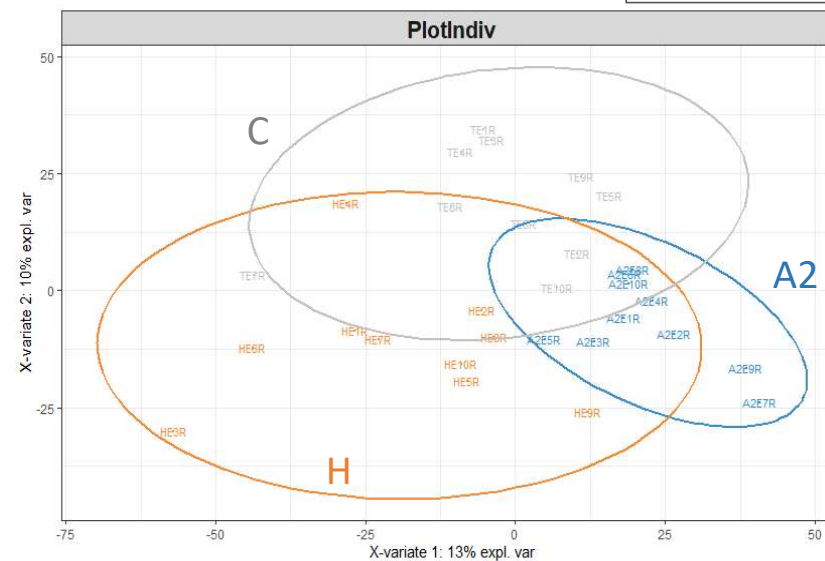
Essai 2 (2021) – Stade après Séchage

Légende:

Compost A2
Compost H
Contrôle non amendé



PLS-DA / Bulbes



PLS-DA / Racines

→ On observe seulement une séparation entre les composts A2 et H pour les bulbes mais sans différence par rapport au contrôle non amendé

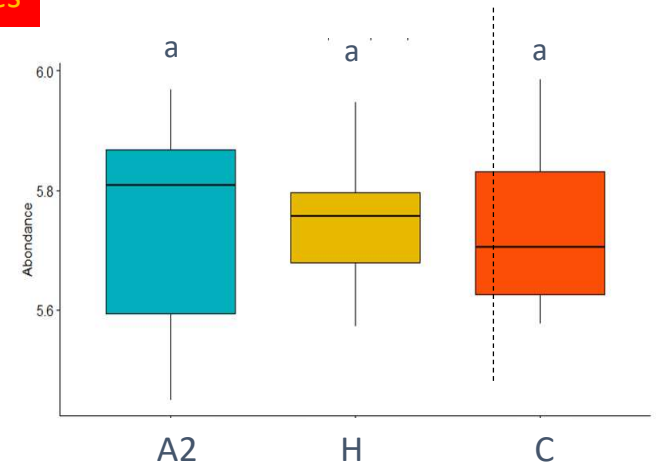
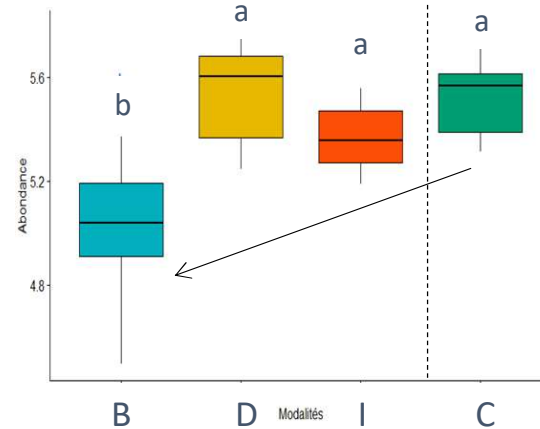
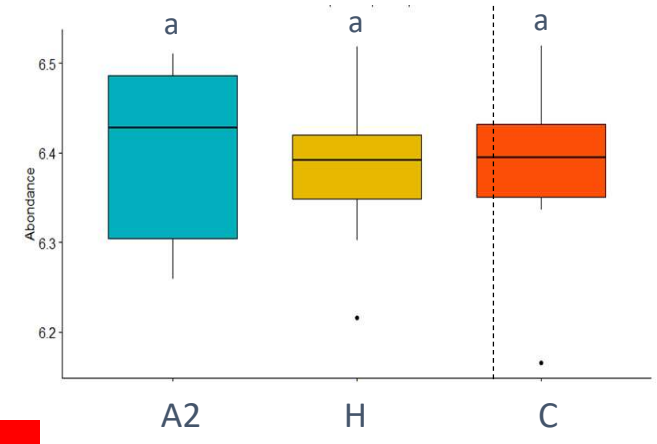
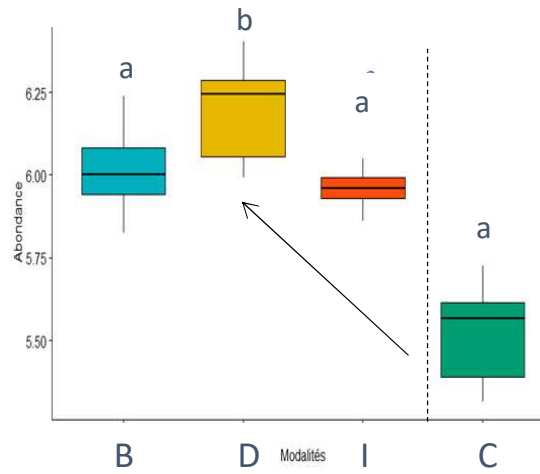
Analyse ciblée sur certains des marqueurs identifiés

Essai 1 2020 – Flavor – stade 6 Feuilles

Essai 2 2021 – Cledor – stade 6 Feuilles

Garlicnine A : composé dont la teneur augmentait dans les aux infectés avec la taille d'inoculum la plus élevée

Garlicnine D : composé dont la teneur diminuait dans les aux infectés avec la taille d'inoculum la plus élevée



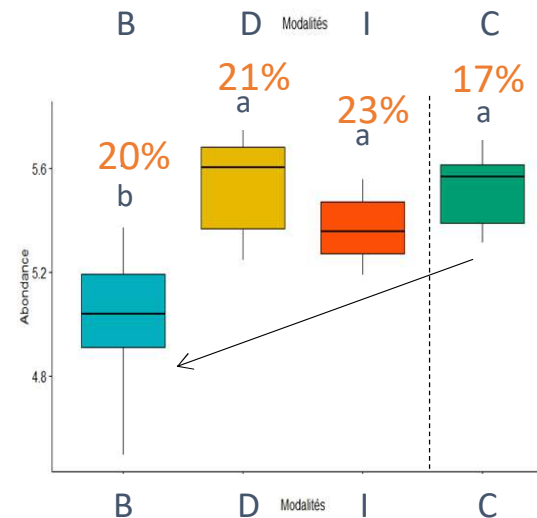
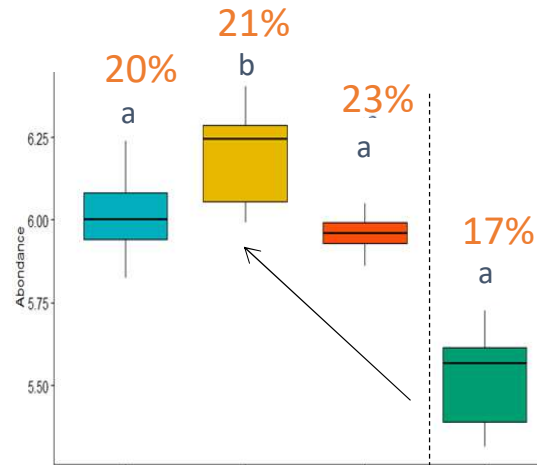
Racines

Analyse ciblée sur certains des marqueurs identifiés

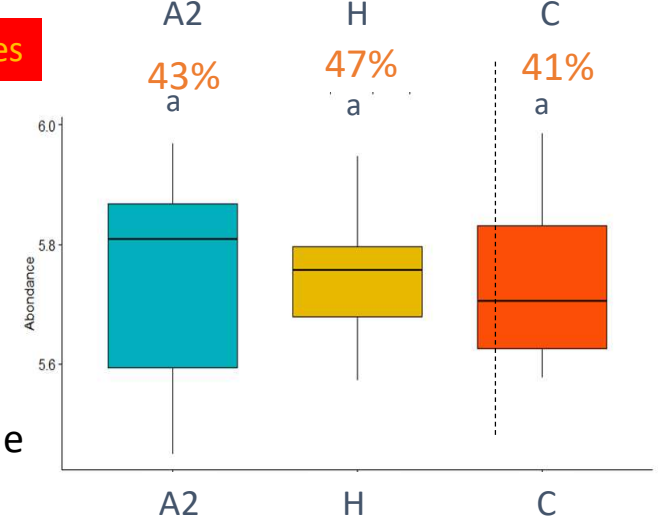
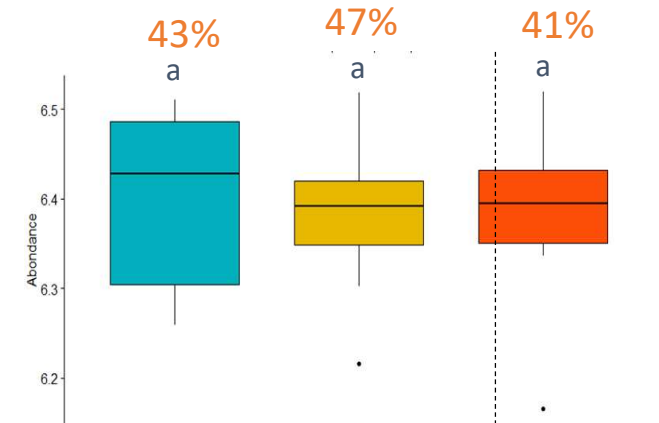
Garlicinine A : composé dont la teneur augmentait dans les aulx infectés avec la taille d'inoculum la plus élevée

Garlicinine D : composé dont la teneur diminuait dans les aulx infectés avec la taille d'inoculum la plus élevée

Essai 1 2020 – Flavor – stade 6 Feuilles



Essai 2 2021 – Cledor – stade 6 Feuilles



Racines

Racine

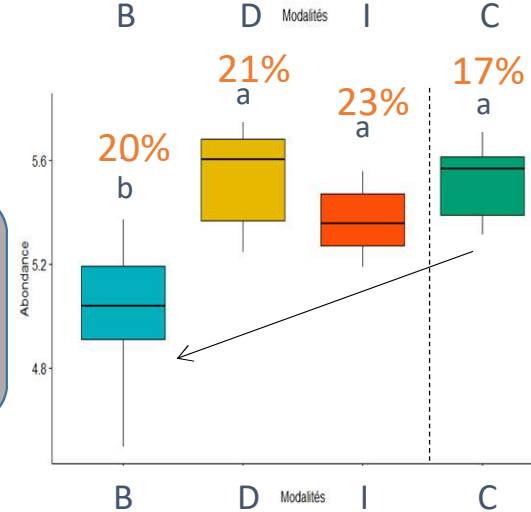
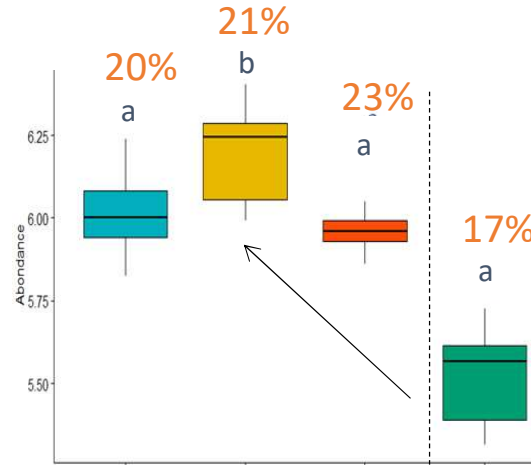
Analyse ciblée sur certains des marqueurs identifiés

Garlicinine A : composé dont la teneur augmentait dans les aux infectés avec la taille d'inoculum la plus élevée

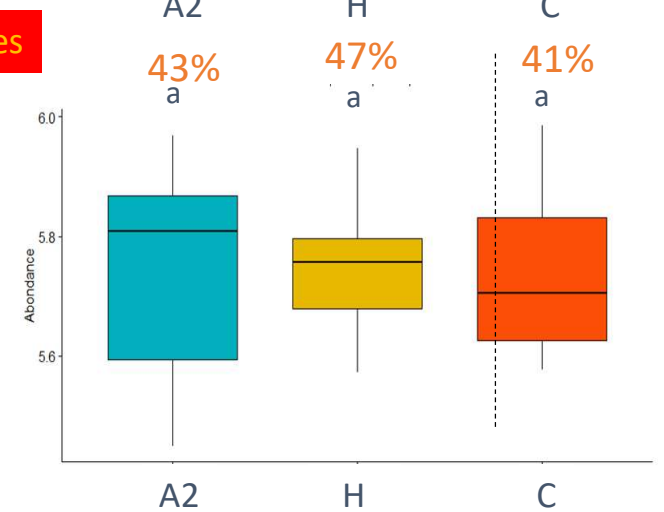
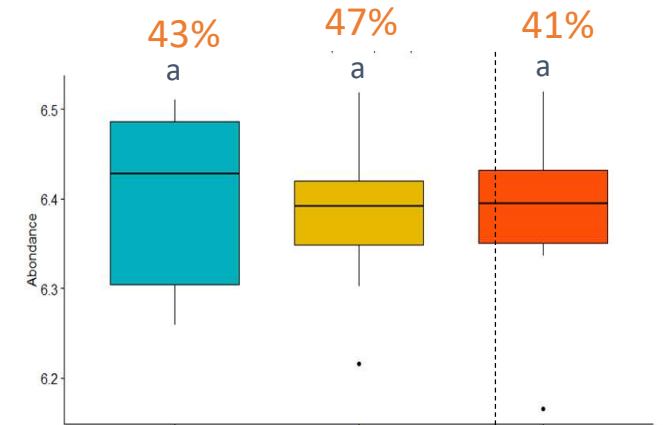
Garlicinine D : composé dont la teneur diminuait dans les aux infectés avec la taille d'inoculum la plus élevée

➔ Des différences sont observées entre des modalités composts vs contrôle mais elles ne sont pas strictement corrélées aux **niveaux de maladie** à la récolte !

Essai 1 2020 – Flavor – stade 6 Feuilles



Essai 2 2021 – Cledor – stade 6 Feuilles



Racines

CONCLUSION

- ✓ Le **métabolisme spécialisé de l'ail** est encore peu connu. Seul un nombre limité de composés ont pu être identifiés.
- ➔ De nouvelles annotations/identifications pourront être menées avec l'avancement des connaissances.

CONCLUSION

- ✓ Le **métabolisme spécialisé de l'ail** est encore peu connu. Seul un nombre limité de composés ont pu être identifiés.
- ➔ De nouvelles annotations/identifications pourront être menées avec l'avancement des connaissances.
- ✓ En cas de **niveaux de maladie** contrastés (CTIFL 2020, conditions contrôlées), on arrive à différencier les métabolomes de l'ail en fonction de la taille de l'inoculum dans tous les tissus
- ➔ Les composés impliqués dans la séparation des métabolomes sont-ils de bons marqueurs de maladie?

CONCLUSION

- ✓ Le **métabolisme spécialisé de l'ail** est encore peu connu. Seul un nombre limité de composés ont pu être identifiés.
 - ➔ De nouvelles annotations/identifications pourront être menées avec l'avancement des connaissances.
- ✓ En cas de **niveaux de maladie** contrastés (CTIFL 2020, conditions contrôlées), on arrive à différencier les métabolomes de l'ail en fonction de la taille de l'inoculum dans tous les tissus
- ➔ Les composés impliqués dans la séparation des métabolomes sont-ils de bons marqueurs de maladie?
 - Encore très difficile à affirmer! Les conditions de maladie au champ n'étaient pas assez contrastées pour pouvoir valider ces marqueurs. Nos analyses ciblées doivent être poursuivies afin de continuer l'étude des variations de leur quantité (en cours).

CONCLUSION

- ✓ Le **métabolisme spécialisé de l'ail** est encore peu connu. Seul un nombre limité de composés ont pu être identifiés.
 - ➔ De nouvelles annotations/identifications pourront être menées avec l'avancement des connaissances.
- ✓ En cas de **niveaux de maladie** contrastés (CTIFL 2020, conditions contrôlées), on arrive à différencier les métabolomes de l'ail en fonction de la taille de l'inoculum dans tous les tissus
 - ➔ Les composés impliqués dans la séparation des métabolomes sont-ils de bons marqueurs de maladie?
 - Encore très difficile à affirmer! Les conditions de maladie au champ n'étaient pas assez contrastées pour pouvoir valider ces marqueurs. Nos analyses ciblées doivent être poursuivies afin de continuer l'étude des variations de leur quantité (en cours).
 - ➔ Le sont-ils pour toutes les variétés?
 - Là encore on ne peut pas l'affirmer! Plusieurs marqueurs identifiés chez Edenrose (CTIFL) ont été retrouvés dans les métabolomes de Flavor et Clédor (Essais Champs).

CONCLUSION

- ✓ Le **métabolisme spécialisé de l'ail** est encore peu connu. Seul un nombre limité de composés ont pu être identifiés.
 - ➔ De nouvelles annotations/identifications pourront être menées avec l'avancement des connaissances.
- ✓ En cas de **niveaux de maladie** contrastés (CTIFL 2020, conditions contrôlées), on arrive à différencier les métabolomes de l'ail en fonction de la taille de l'inoculum dans tous les tissus
 - ➔ Les composés impliqués dans la séparation des métabolomes sont-ils de bons marqueurs de maladie?
 - Encore très difficile à affirmer! Les conditions de maladie au champ n'étaient pas assez contrastées pour pouvoir valider ces marqueurs. Nos analyses ciblées doivent être poursuivies afin de continuer l'étude des variations de leur quantité (en cours).
 - ➔ Le sont-ils pour toutes les variétés?
 - Là encore on ne peut pas l'affirmer! Plusieurs marqueurs identifiés chez Edenrose (CTIFL) ont été retrouvés dans les métabolomes de Flavor et Clédor (Essais Champs).

Perspectives à long terme : Méthode de détection précoce de la maladie au champ basée sur l'expression des gènes impliqués dans leur voie de biosynthèse ???

Remerciements

Equipe Rhizosphère



- Marjolaine Rey, Pierre-Edouard Mercier, Gilles Comte
- Sylvain Revol et Emiliano Serviole (nos stagiaires)

Plateforme CESN



Centre d'Etude des Substances Naturelles

Collaborateurs



- **Tous les partenaires** du projet SYNERGIES en particulier l'ACTA (coordinateur), le CTIFL de Balandran, la SERAIL et la CA26



Avec la contribution financière du compte d'affectation spéciale développement agricole et rural CASDAR



MINISTÈRE DE L'AGRICULTURE ET DE LA SOUVERAINETÉ ALIMENTAIRE

*Liberté
Égalité
Fraternité*

Webinaire Maîtriser la fusariose de l'ail avec des leviers agroécologiques ? 17/11/2022