

**GÉNOMIQUE COMPARATIVE ET MÉCANISMES MOLÉCULAIRES
DE LA RÉSISTANCE QUANTITATIVE À *APHANOMYCES EUTEICHES*
CHEZ LES PRINCIPALES LÉGUMINEUSES À GRAINES**

Thèse de Théo **LEPRÉVOST**¹

Analysée par André **GALLAIS**²

Directrice de thèse : Marie-Laure **PILET-NAYEL**, Directrice de recherche - INRAE, UMR IGEPP, Rennes

Co-directrice de thèse : Akiko **SUGIO**, Directrice de recherche - INRAE, UMR IGEPP, Rennes

Cadre général de la thèse

Le travail de thèse de Théo Leprévost est d'une grande importance pour l'avenir de l'agriculture confrontée au changement climatique et à la nécessité de protéger l'environnement (économie d'énergie et d'engrais azotés). En effet, pour répondre à ces deux problèmes, le développement dans l'assolement de la culture de légumineuses, en culture pure ou en association (et même sous couvert), est une solution. Malheureusement pour le pois protéagineux, sa sensibilité à la pourriture racinaire molle, due à *Aphanomyces euteiches*, a entraîné une forte régression de cette culture, voire sa disparition des assolements céréaliers. *Aphanomyces euteiches* est un champignon oomycète tellurique (qui vit dans le sol), agent de la pourriture racinaire molle qui menace aussi d'autres légumineuses. Aucune méthode de lutte chimique n'est efficace pour aider les agriculteurs à contrôler la maladie. Au niveau agronomique, pour cultiver des légumineuses, il faudrait alterner dans la rotation des espèces sensibles et des espèces non-hôtes (lupin, pois-chiche) ou résistantes (féverole, soja), mais ce n'est pas toujours évident selon les régions et les sols. La résistance génétique du pois protéagineux et d'autres espèces de légumineuses faciliterait donc leur insertion dans l'assolement. Cette thèse ouvre les portes à la création de variétés de pois protéagineux résistantes ou tolérantes à *Aphanomyces euteiches*. De plus, elle explore aussi les bases génétiques de la résistance quantitative à la maladie chez d'autres légumineuses à graines (féverole, lentille et *Medicago truncatula*, légumineuse modèle des génomiciens), ce qui lui donne encore plus de portée.

Les principaux apports de la thèse

¹ Thèse pour obtenir le grade de Docteur de l'Institut Agro Rennes-Angers, École doctorale n°600, Écologie, Géosciences, Agronomie, Alimentation, Spécialité : Biologie et Physiologie végétales, préparée à l'UMR de l'Institut de génétique, environnement et protection des plantes (IGEPP), INRAE Rennes, présentée et soutenue le 26 septembre 2024 à Institut Agro Rennes-Angers.

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

Dans un premier chapitre bibliographique, Théo Leprévost a fait une revue des travaux déjà réalisés sur les bases génétiques et moléculaires de la résistance quantitative. Cette résistance est souvent polygénique, à l'opposé de la résistance qualitative qui est monogénique. Il souligne l'importance de cette forme de résistance pour contrôler durablement les agents pathogènes des cultures. Les recherches menées à l'INRAE avaient déjà permis d'identifier des régions du génome contrôlant la résistance partielle à *Aphanomyces* chez le pois. Un QTL (Quantitative Trait Locus) (*Ae-Ps7.6*) a montré un effet majeur de résistance partielle face au pathotype I, exclusivement présent en France. Peu de connaissances étaient disponibles sur les mécanismes sous-jacents aux QTL de résistance partielle détectés. Tant d'un point de vue fondamental qu'appliqué (pour la sélection de variétés résistantes), il était nécessaire d'aller plus loin dans l'analyse génétique de la résistance, avec, notamment, l'exploration de la conservation des mécanismes génétiques de résistance pour différentes espèces de Fabacées. La thèse a alors eu trois objectifs complémentaires : 1) Caractériser l'architecture génétique de la résistance du pois à *Aphanomyces* ; 2) Identifier les gènes candidats et les mécanismes moléculaires sous-jacents à un QTL majeur (*Ae-Ps7.6*) du pois et 3) Etudier la synténie, la conservation des mécanismes de résistance quantitative entre plusieurs espèces de légumineuses Fabacées.

Le deuxième chapitre a visé à caractériser la diversité et l'architecture génétique de la résistance chez le pois par deux approches complémentaires : 1) par l'analyse de deux populations de back-cross avancé (en ségrégation pour des gènes de résistance) et 2) par la réanalyse des données de détection de QTL et de GWAS (*Genome Wide Association Study* ou génétique d'association) à partir de quatre populations de lignées recombinantes et d'une collection « Pois-*Aphanomyces* », avec l'ajout de 1850 marqueurs moléculaires (SNP, *Single Nucleotidic Polymorphism*), incluant ceux utilisés dans la première analyse. Un total de 29 SNP associés à la résistance et 171 QTL ont été détectés. Compte tenu des colocalisations des QTL, cela conduit à l'identification de dix régions génomiques principales. Ces régions confirment celles déjà mises en évidence et publiées, dont le QTL « majeur » *Ae-Ps7.6*. Aucune nouvelle région associée à la résistance partielle n'a été identifiée. Cependant, il faut noter que la diversité génétique pour la résistance dans le compartiment sauvage n'a pas été explorée. C'est néanmoins une contribution importante à la compréhension de l'architecture de la résistance partielle à *Aphanomyces* chez le pois. Du point de vue appliqué, elle apporte des marqueurs moléculaires pertinents des QTL identifiés, indispensables pour leur utilisation dans les programmes de sélection. Les résultats de cette partie ont été publiés dans une revue internationale « *Frontiers in Plant Science* ».

Le troisième chapitre concerne l'identification des mécanismes moléculaires sous-jacents au QTL majeur de résistance partielle (*Ae-Ps7.6*) mis en évidence chez le pois, et ceci par une étude histologique et une analyse transcriptomique au niveau racinaire de lignées NIL (*Near Isogenic Lines*, différant par la présence ou l'absence du QTL mis en évidence). La cinétique de la colonisation des racines par le champignon a été explorée dans les NIL par la notation des symptômes et par microscopie à épifluorescence. Une cartographie fine du QTL majeur (*Ae-Ps7.6*), responsable d'une résistance partielle, localisé sur le chromosome 7, a été réalisée avec une bonne précision, ce qui a permis de réduire le nombre de gènes candidats.

Trente-trois candidats sous-jacents ont été identifiés, ce qui est encore beaucoup. L'analyse transcriptomique a permis d'identifier de nombreux gènes différentiellement exprimés chez les lignées sensibles et les lignées partiellement résistantes. Ces travaux apportent 1) de nouveaux marqueurs SNP liés au QTL *Ae-Ps7.6*, 2) une meilleure compréhension des mécanismes moléculaires associés aux réponses immunitaires du pois à l'infection par *Aphanomyces*, et 3) des pistes pour l'identification et la validation de gènes candidats pour le QTL *Ae-Ps7.6*.

Le quatrième chapitre a eu pour objectif d'étudier la conservation des QTL de résistance quantitative chez quatre légumineuses fabacées, le pois, la féverole, la lentille et *Medicago truncatula*. Ce choix est justifié par les relations phylogénétiques étroites entre ces espèces et le niveau élevé de synténie entre leurs génomes, ainsi que par le fait que ces espèces peuvent être infectées par des isolats communs d'*Aphanomyces*. Pour cela, Théo Leprévost a d'abord repris les résultats d'une population de RIL chez la féverole, étudiée avant sa thèse, et il a étudié, par GWAS, 321 accessions chez la lentille. Pour *M. truncatula* il a repris une analyse précédemment publiée, en y ajoutant de nouveaux marqueurs moléculaires. Il a ainsi pu caractériser l'architecture génétique de la résistance chez ces trois espèces. Chez la féverole, un QTL majeur de résistance au pathotype III (*Ae-Vf3.1*) a été identifié. Chez la lentille, six SNP à effets mineurs ont été identifiés. Chez *M. truncatula* les QTL détectés dans l'étude déjà publiée ont été confirmés avec une plus grande précision. À partir des résultats obtenus par ces études, et de ceux déjà publiés, 65 QTL synténiques, au total, ont été mis en évidence entre les quatre génomes. Les QTL « conservés » correspondent à des QTL mineurs, aucun QTL à « effets forts » n'a été conservé au cours de l'évolution des quatre fabacées étudiées. Les analyses suggèrent des déterminants génétiques spécifiques à chacune des quatre espèces. Pour expliquer ce résultat, il est possible que la diversité génétique étudiée au sein des quatre espèces ait été insuffisante. Ces résultats sont en cours de publication (acceptée) dans la revue internationale *Theoretical and Applied Genetics*. D'un point de vue agronomique, le manque de conservation synténique des mécanismes de résistance est intéressant. En effet, la rotation culturale de variétés de pois avec le locus *Ae-Ps7.6* et de variétés de féveroles avec le locus *Ae-Vf3.1* permettrait de diversifier les pressions de sélection des cultures sur les populations de l'agent pathogène, limitant ainsi son développement.

Dans le dernier chapitre (Discussion générale, perspectives et conclusion), Théo Leprévost a récapitulé les principaux résultats obtenus, en a montré leur portée et leurs limites et a souligné quelques pistes de recherches à continuer ou à entreprendre. Il pense en particulier que la diversité génétique explorée pour le pois et la lentille n'a sans doute pas été assez large et que les efforts de recherche de nouveaux allèles de résistance doivent être poursuivis, notamment dans le matériel sauvage ou des espèces apparentées (par exemple chez *Pisum fulvum* pour le pois). De plus, des analyses de QTL de résistance pourraient être envisagées chez les légumineuses fourragères, telles que la luzerne ou la vesce, espèces hôtes du champignon. Pour valider des gènes candidats associés au QTL majeur *Ae-Ps7.6*, des travaux d'étude de mutants sont en cours ; une approche par mutagenèse dirigée par CRISPR-Cas9 est envisagée. La validation fonctionnelle de gènes candidats pourra être réalisée plus facilement chez *Medicago truncatula*.

Conclusion

L'ensemble du travail réalisé par Théo Leprévost dépasse largement le cadre de la résistance des légumineuses à *Aphanomyces euteiches*. Du point de vue fondamental, c'est une contribution importante à l'étude des mécanismes de résistance partielle à ce champignon chez les Fabacées et au-delà. Du point de vue appliqué, les conclusions de cette étude devraient permettre d'augmenter la résistance partielle des Fabacées cultivées, notamment du pois protéagineux, à *Aphanomyces euteiches*, par l'utilisation des marqueurs moléculaires de certains QTL, et le développement d'une sélection assistée par marqueurs pour cette résistance combinée à d'autres caractères agronomiques. Cela sera facilité par l'identification réalisée d'une part de génotypes porteurs d'allèles de résistance, et d'autre part de marqueurs des allèles de résistance. Ce travail débouche aussi sur des préconisations agronomiques (choix de variétés) pour l'introduction de différentes légumineuses dans l'assolement. Puisse ce travail contribuer au re-développement de la culture du pois protéagineux !

Au cours de sa thèse, Théo Leprévost a mis en œuvre une gamme variée d'outils avec beaucoup de rigueur : développement de marqueurs moléculaires, cartographie de QTL, GWAS, analyse transcriptomique, analyse synténique ; il a montré qu'il les maîtrisait bien et il a acquis une grande expérience pour la recherche et l'utilisation des mécanismes de résistance génétique à *Aphanomyces* chez différentes Fabacées. Tout ce travail, avec les résultats obtenus, a répondu à une attente des sélectionneurs de pois protéagineux.

C'est donc un excellent travail sur le plan scientifique, avec des perspectives d'applications importantes pour l'agriculture. A ce titre, il mérite que cette analyse figure sur le Site et dans le Mensuel de l'Académie d'agriculture de France, à titre de valorisation de ces travaux.

Valorisation des résultats (publications réalisées ou en cours et conférences)

Leprévost, T., Boutet, G., Lesné, A., Rivière, J.-P., Vetel, P., Glory, I., Miteul, H., Le Rat, A., Dufour, P., Regnault-Kraut, C., Sugio, A., Lavaud, C., Pilet-Nayel, M.-L. (2023). Advanced backcross QTL analysis and comparative mapping with RIL QTL studies and GWAS provide a overview of QTL and marker haplotype diversity for resistance to *Aphanomyces* root rot in pea (*Pisum sativum*). *Front. Plant Sci.* 14, 1189289. doi: 10.3389/fpls.2023.1189289.

Leprévost, T., Imbert, B., Boutet, G., Lavaud, C., Miteul, H., Leduc, A., Aubert, G., Kreplak, J., Carrillo-Perdomo, E., Uhdre, R., Sari, H., Bourland, B., Caron, C.T., Tayeh, N., Ma, Y., Coyne, C.J., Sugio, A., and Pilet-Nayel, M.-L. Comparative genomic analysis of QTL for resistance to *Aphanomyces euteiches* between pea, lentil, faba bean and the model species *Medicago truncatula*. *Theor Appl Genet*. [Accepted for publication, Preprint available at <https://doi.org/10.21203/rs.3.rs-5759185/v1>]

Lavaud, C., Lesné, A., **Leprévost, T.**, and Pilet-Nayel, M.-L. (2024). Fine mapping of Ae-Ps4.5, a major locus for resistance to pathotype III of *Aphanomyces euteiches* in pea. *Theor Appl Genet*. 137(2):47. doi: 10.1007/s00122-024-04548-6.

Moussart, A., Lavaud, C., Onfroy, C., **Leprévost, T.**, Pilet-Nayel, M.-L., Le May, C. (2024). Pathotype characterization of *Aphanomyces euteiches* isolates collected from pea breeding nurseries. *Front. Plant Sci.* 15. doi: 10.3389/fpls.2024.1332976

Conférences

Leprévost, T., Boutet, G., Lesné, A., Rivière, J.-P., Vetel, P., Glory, I., Miteul, H., Le Rat, A., Sugio, A., Lavaud, C., Pilet-Nayel, M.-L. An overview of the diversity of QTL and haplotypes for resistance to *Aphanomyces* root rot in pea (*Pisum sativum*). “8th International Legume Root Diseases (ILRD) workshop” hold online on August 23th to 26th 2022 in Rennes (France).

Leprévost, T., Dejean, M., Lesné, A., Miteul, H., Rivière, J.-P., Glory, I., Lavaud, C., Sugio, A., Conéjéro, G., Pilet-Nayel, M.-L. Quantitative fluorescence imaging: a valuable method to study the development of *Aphanomyces euteiches* in pea near-isogenic lines. “11ème session des Journées Scientifiques et Techniques (JST) du réseau des microscopistes de l’INRAE” hold on November 23th to 25th 2022 in Rennes (France).