

2024-2025

Master 1 de Biologie Végétale

**EFFET DES COMMUNAUTES
MICROBIENNES SUR L'ACTIVITE DE
L'EXUDOME *D'ARABIDOPSIS
THALIANA* VIS-A VIS DE LA PLANTE
PARASITE *PHELIPANCHE RAMOSA***

DEBORAH LEUGINER

Sous la direction d'Alexis PORCHER

STAGE REALISE A L'US2B DE NANTES

DU 14/04/25 AU 25/07/25

Maîtresse de stage : Lucie Poulin

Jury

Président : Jérémy CLOTAULT

Tuteur : Alexis PORCHER

Auditeur : Pascal POUPARD

Soutenu publiquement le 01/07/2025



AVERTISSEMENT

L'université n'entend donner aucune approbation ni improbation aux opinions émises dans les travaux des étudiant·es : ces opinions doivent être considérées comme propres à leurs auteurs.

REMERCIEMENTS

Ce rapport est l'aboutissement de plus de deux mois de stage au sein du laboratoire US2B. Ce stage ne se serait pas aussi bien déroulé sans l'aide et la supervision de mon maître de stage et de son doctorant.

C'est pour cela que j'aimerais tout d'abord remercier Lucie POULIN qui m'a auditionné et m'a offert l'opportunité de travailler sur le sujet passionnant que sont les plantes parasites. Son aide tout au long du stage pour orienter mes travaux et mes analyses fut précieuse et pleine d'enseignements, de même que ses conseils et le temps qu'elle m'a dédié le temps de l'écriture de ce rapport.

C'est ensuite Ahmed CHOUKRI, doctorant au sein de l'équipe et mon second encadrant le temps de ce stage, que j'aimerais remercier. Tout d'abord pour le temps qu'il m'a consacré tout au long de ces mois pour m'enseigner les différents protocoles et méthodologies. Je lui suis aussi très reconnaissante pour son implication et enthousiasme lors de la découverte de mes différents résultats. J'ai beaucoup aimé imaginer des protocoles ensemble pour explorer le large sujet de ce stage.

Je tiens à remercier chaleureusement l'ensemble de l'équipe de Rhizoplane pour son accueil et pour m'avoir offert l'opportunité de réaliser ce stage à leurs côtés. Tout particulièrement Sabine DELGRANGE ainsi que Zoé LACON qui n'ont jamais hésité à m'aider lorsque j'en avais besoin. Je pense également aux doctorants de l'équipe, Julien AFFHOLDER et Mohammadreza NESHAT, toujours là pour répondre à mes questions aussi bien sur la vie des doctorants que sur la mise en place de protocoles.

Ensuite j'aimerais remercier l'équipe pédagogique du master de Biologie Végétale, mon tuteur, Alexis PORCHER, ainsi que l'ensemble des enseignants chercheurs de l'université de Nantes présents durant ce stage.

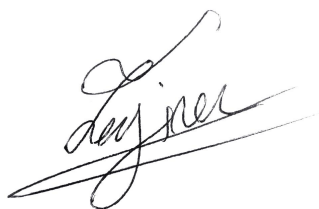
Et enfin j'aimerais remercier l'ensemble des stagiaires que j'ai croisés durant ce stage qui m'ont présenté leur sujet et fait découvrir de nombreuses autres thématiques toutes passionnantes. J'aimerais tout particulièrement remercier Candice CHESNAIS qui a été un vrai support tout au long de cette expérience.

ENGAGEMENT DE NON-PLAGIAT

Je, soussignée Déborah Leuginer

déclare être pleinement consciente que le plagiat de documents ou d'une partie d'un document publiée sur toutes formes de support, numérique ou papier, constitue une violation des droits d'auteur ainsi qu'une fraude caractérisée. En conséquence, je m'engage à citer toutes les sources que j'ai utilisées pour écrire ce rapport.

Signé par l'étudiante le 24/ 06 / 2025

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'Leuginer', with a long horizontal stroke extending to the right.

LISTE DES ABREVIATIONS

DO : Densité optique

GNT : Gluconasturtine

GSL-pNP : Glucosinolate p-nitrophenoxy

ITC : Isothiocyanates

MTT : Bromure de méthylthiazolyldiphényltétrazolium

PGPR : Plant Growth Promoting Rhizobacteria

pNP : Para-nitrophénol

PPM : Plant Preservative Mixture

HEPES : Acide 4-(2-hydroxyéthyl)-1-pipérazine éthane sulfonique

SL : Strigolactone

SG : Stimulant de germination

TDZ : Thidiazuron

SOMMAIRE

Introduction	1
I-Présentation du laboratoire	1
II-Les plantes parasites	1
1-En général.....	1
2- <i>Phelipanche ramosa</i>	2
III-Le stage	4
Matériel(s) et méthodes	6
I-Matériel biologique	6
1-Matériel végétal	6
2-Sol	7
3-Bactéries	7
II-Criblage de bactéries	8
1-Tests biologiques.....	8
III-Culture d' <i>Arabidopsis thaliana</i> dans un système miniaturisé avec recirculation continue du milieu (ExuFlow)	10
1-Système de culture miniaturisé	10
2-Tests de germination sur les exsudats.....	11
Résultats	12
I-Criblage de bactéries	12
1-Tests biologiques.....	12
II-Culture d' <i>Arabidopsis thaliana</i> dans un système miniaturisé avec recirculation continue du milieu (ExuFlow)	13
1-Tests de germination sur les exsudats.....	13
Discussion	15
I-Criblage de bactéries	15
1-Tests de germination et d'inhibition	15
2-Caractère innovant des approches expérimentales.....	15
II-Culture d' <i>Arabidopsis thaliana</i> dans un système miniaturisé avec recirculation continue du milieu (ExuFlow)	16
1-Inoculations de macérats de sol	16
2-Inoculations d'une bactérie	17
3-Impact sur la morphologie des plantes	17
4-Caractère innovant des approches expérimentales.....	18
Conclusion	19
Bibliographie	20

INTRODUCTION

I-PRESENTATION DU LABORATOIRE

L'Unité en Sciences Biologiques et Biotechnologies (US2B) est un laboratoire académique issu de la fusion de deux laboratoires : l'Unité Fonctionnalité et Ingénierie des Protéines (UFIP) et le Laboratoire de Biologie et Pathologie Végétales (LBPV). Le laboratoire est composé de 5 équipes travaillant sur des sujets distincts :

- Bioinformatique Structurale
- Ingénierie Moléculaire et Glycobiologie
- Mécanisme et régulation de la réparation de l'ADN
- Interactions plante-plante et signaux rhizosphériques
- Epigénomique des microalgues et interactions avec l'environnement

L'équipe que j'ai intégrée, l'équipe Rhizoplande, cherche à caractériser les interactions plante-plante impliquant des plantes parasites obligatoires de racines. Pour cela des méthodes biologiques, biochimiques, génétiques et génomiques sont employées. Les deux plantes parasites au centre des recherches sont des orobanches (*Phelipanche ramosa* et *Orobanche cumana*). L'orobanche est une plante sans chlorophylle dépendant entièrement de son hôte. Plusieurs espèces du genre sont d'importantes nuisances pour les cultures agricoles. Les agriculteurs de l'ouest de la France sont particulièrement impactés et voient leur rendement diminuer. Les plantes hôtes sont nombreuses allant des *Solanaceae* telles que la tomate ou le tabac, aux *Brassicaceae* comme le chou ou bien encore les *Asteraceae* avec le tournesol.

II-LES PLANTES PARASITES

1- En général

Il existe près de 4750 espèces de plantes parasites présentant une très grande diversité de morphologies et de stratégies parasitaires. Elles se distinguent, dans un premier temps, par leur site de fixation à leur hôte : 40% d'entre-elles sont des parasites de tiges, épiphytes, tandis que 60% sont des parasites racinaires, épirhizes. Leur degré de dépendance à leur hôte est également discriminant. Les parasites facultatifs peuvent réaliser l'entièreté de leur cycle de vie sans leur hôte mais leur développement peut s'en voir diminué. A l'inverse les parasites obligatoires ne peuvent pas survivre et réaliser leur cycle de vie sans la présence de leur hôte au moins pour un temps. Et enfin il est possible de les caractériser par leur capacité à réaliser la photosynthèse ou non et par conséquent à détourner seulement l'eau et les minéraux ou bien l'ensemble des nutriments de leur hôte. Dans le premier cas on dit qu'il s'agit d'hémiparasites sinon d'holoparasites. (Brun et al, 2021)

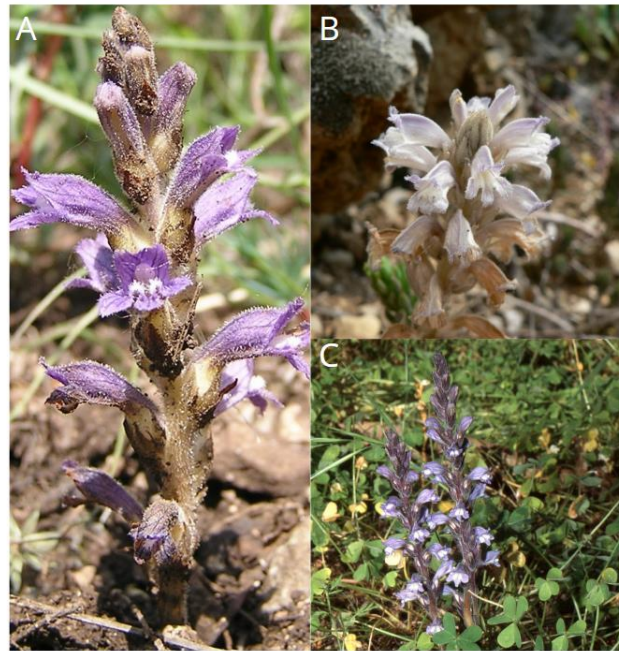


Figure 1 : Organes aériens de *Phelipanche ramosa*
 A : Vue d'ensemble de la morphologie (Robert LERAS [CC BY-SA 2.0 FR])
 B : *P.ramosa* en fin de cycle de vie (Mathieu MENAND [CC BY-SA 2.0 FR])
 C : Port général de *P.ramosa* (Liliane Roubaudi [CC BY-SA 2.0 FR])
 Via Tela Botanica

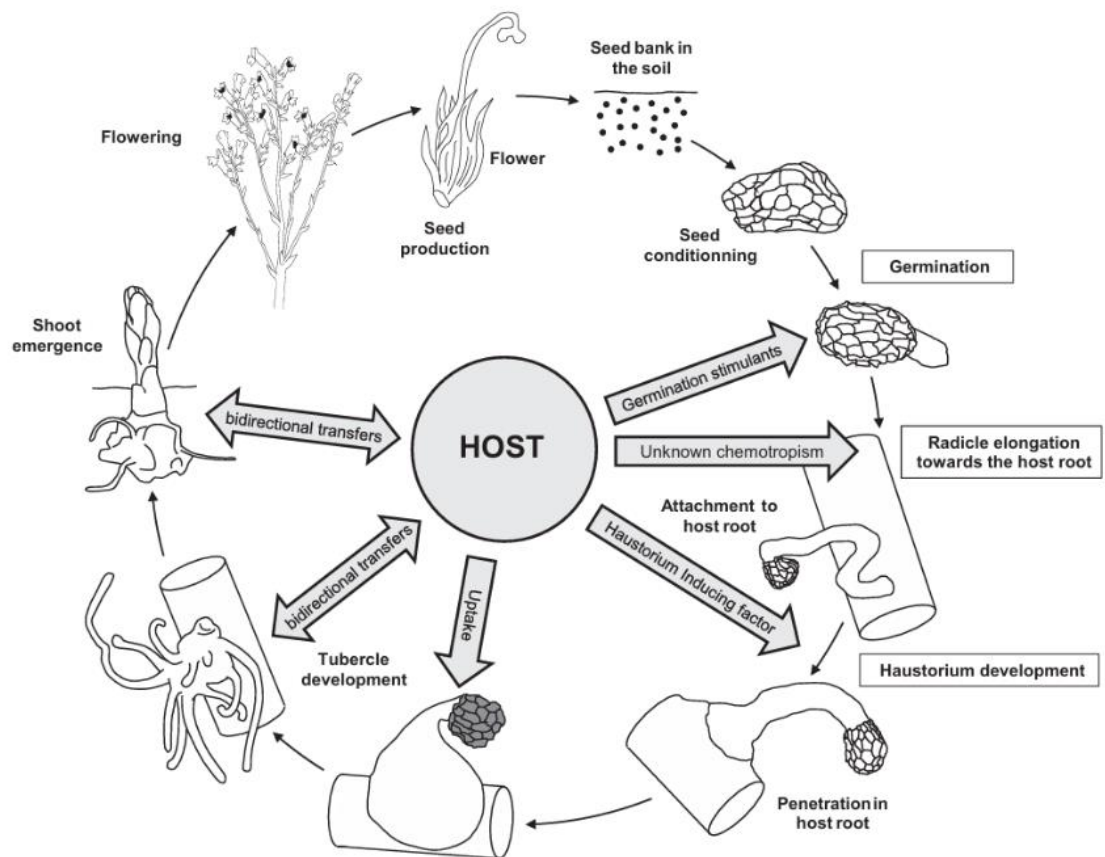


Figure 2 : Cycle de vie de *P.ramosa* d'après Delavault et al. 2017

2- *Phelipanche ramosa*

2.1- Description générale

Phelipanche ramosa, voir Figure 1, est une plante holoparasite de la famille des *Orobanchaceae* s'attaquant principalement aux *Brassicaceae* telles que le colza et aux *Solanaceae* telles que le tabac ou la tomate (Brun et al, 2018). Cet holoparasite qui s'est extrêmement bien adapté à plusieurs hôtes, provoquent d'importantes pertes culturelles dans le monde et notamment en France. Son adaptation au colza, l'un de ses hôtes préférentiels, peut provoquer jusqu'à 80% de perte de rendement (Gibot-Leclerc, 2012). Toutefois son existence ne se limite pas aux cultures et il est possible de la retrouver parasitant diverses adventices. Plus de 70 espèces d'adventices ont été recensées, facilitant ainsi la persistance et la dispersion du parasite dans les champs même en l'absence de cultures hôtes. (Gibot-Leclerc, 2016). Outre l'impact important sur nos cultures et donc sur la sécurité alimentaire et économique de nombreux pays, les plantes parasites impactent la diversité et l'environnement des communautés végétales de manière globale. Certaines plantes parasites, agressives, peuvent entraîner la disparition d'un hôte au sein d'une communauté (Malcolm et al, 2005). Mais cela n'est qu'un point parmi d'autres : modification des relations concurrentielles, altération des cycles de reproduction ou bien encore zonation sont des conséquences pouvant survenir suite à l'implantation d'une plante parasite (Fisher et al, 2013)

Son contrôle est fastidieux et complexe dû aux caractéristiques de ses graines. *P. ramosa* produit, par rapport à de nombreuses plantes non-parasites ou hémiparasites, de très petites graines, 200µm en moyenne. De plus une plante mature peut relâcher 10 à 100 milliers de ses graines chaque année, qui peuvent rester viables plus d'une décennie dans le sol (Brun et al, 2021)

2.2- Cycle de vie

Tout d'abord la graine a besoin d'une période de conditionnement, pouvant aller de plusieurs jours à plusieurs semaines, consistant en une exposition à un environnement chaud et humide. Chez *P. ramosa*, les graines ont besoin d'au moins 4 jours à 21°C pour finaliser leur conditionnement. Après cette période les graines deviennent sensibles à des stimulants de germination (SG) (Auger et al, 2012). La graine parasite une fois conditionnée et ayant détectée des SG initie sa germination, voir Figure 2. La radicule ou le "tube germinatif" se dirige vers la racine de l'hôte grâce à un mécanisme de chimiotropisme. Au niveau du point de contact avec son hôte, les cellules de l'extrémité de la radicule se différencient en une structure en "papilles". Ces structures permettent l'adhésion de la plante aux racines de l'hôte et donc le début de la phase parasitaire de l'orobanche (Delavault et al, 2016). Les papilles sécrètent une substance adhésive permettant l'attachement à l'hôte puis d'aider à la pénétration de l'haustorium en exerçant une force mécanique sur le tissu. La plante parasite pénètre les tissus racinaires de son hôte jusqu'aux vaisseaux conducteurs pour créer une connexion directe (Yoshida et al, 2016) et détourner nutriments et eau via le xylème mais également les photo-assimilats via le phloème. Il a également été démontré que des protéines, virus et ARNs circulent via ce pont pouvant même parfois permettre d'impacter l'expression de gènes importants pour la résistance de l'hôte (Kokla et al, 2018).

2.3- Les stimulants de germination (SG)

Les stimulants de germination évoqués plus tôt sont des composés exsudés par les racines de la plante hôte que la plante parasite est capable de reconnaître même à très faibles concentrations. Il s'agit d'une étape critique lors de l'interaction entre le parasite et son hôte, celle de la détection. Les SG les plus répandus appartiennent à la famille des strigolactones (SL). Il s'agit d'hormones végétales impliquées dans plusieurs voies de signalisation telles que la régulation des ramifications. Il est possible de les trouver dans les exsudats racinaires de nombreuses monocotylédones et dicotylédones pouvant ainsi être perçus par les graines de certaines plantes parasites (Auger et al, 2012)

D'après des études dans des champs de colza (*Brassica napus*) infestés par *P. ramosa* de l'activité myrosinase ainsi que la présence d'isothiocyanates (ITC) ont été enregistrés au niveau de la rhizosphère des plantes hôtes. Les isothiocyanates sont des métabolites issus de l'hydrolyse de glucosinolates par des myrosinases. Les glucosinolates sont une famille de métabolites secondaires constituant la voie de signalisation la plus importante dans la rhizosphère des Brassicacées. Suite à des tests de germination sur *P. ramosa* avec différents SL et ITC, il a été démontré que ces derniers pouvaient également induire la germination de la plante parasite. Il est ainsi suggéré que les glucosinolates exsudés par *B. napus* sont hydrolysés dans la rhizosphère en ITC, participant alors à l'interaction entre *B. napus* et *P. ramosa*. (Auger et al, 2012)

2.4- Le microbiote

Les métabolites impliqués dans la régulation de la germination de *P. ramosa* ont également un impact important sur les communautés microbiennes présentes dans la rhizosphère, induisant une forte sélection sur le microbiote présent (Chen et Liu, 2024). Toutefois le microbiote pourrait également jouer un rôle en modifiant les profils métaboliques des glucosinolates et des ITC.

2.4.1 - Activité promotrice de germination

Plusieurs études ont démontré l'impact de certaines communautés microbiennes sur la germination. En effet, certaines communautés favoriseraient le développement de plantes parasites et ne seraient d'ailleurs pas présentes dans les sols non-infectés. Il y a l'exemple de *Lysobacter antibioticus* HX79, qui est une bactérie rhizosphérique trouvée dans des champs de tournesols infectés par *Orobancha cumana*. Il est proposé dans l'article de Xi et al 2022 que les métabolites produits par la bactérie interagiraient avec les exsudats racinaires, notamment des SL, du tournesol et favoriseraient la germination de la plante parasite.

Dans l'article de Martinez et al, 2023 il est démontré que certains sols influenceraient les interactions entre *P. ramosa* et *B. napus*. Des échantillons de sol ont été récupérés aléatoirement dans un champ infesté par *P. ramosa*. Puis des macérats de sols ont été réalisés afin d'isoler et caractériser les microorganismes bactériens et fongiques présents dans ce sol. Des tests de germination et de formation du préhaustorium ont été réalisés *in vitro* en plaque. Dans un premier temps aucune germination n'a été

observée lorsque les micro-organismes seuls étaient mis en contact des graines. Alors que lorsqu'un glucosinolate était ajouté la germination des graines était constatée. Ensuite des essais de co-cultures entre *B. napus* et *P. ramosa* ont montré qu'en l'absence de microorganismes dans le sol, *B. napus* seul induisait la germination de 45% des graines de l'orobanche suggérant la présence de SG au niveau de la rhizosphère. Toutefois avec l'ajout de microorganismes du sol la germination de la plante parasite était favorisée et accélérée, témoignant d'une amplification du signal de germination. Mais il est important de préciser qu'à ce jour aucune étude ne démontre la production de SG directement par un micro-organisme. Ce qui a été démontrée ici est l'interaction entre les exsudats de *B. napus* et des micro-organismes du sol. Il est ressorti comme conclusion qu'il y aurait une transformation des glucosinolates produits par *B. napus* en SG par les enzymes myrosinases du microbiote du sol.

2.4.2 - Activité inhibitrice de germination

Des modes d'actions d'inhibition de la germination ont également été décrites. Par exemple, il a été démontré que 2 souches bactériennes endophytes de racines de tomate pouvaient réduire la germination de *Phelipanche aegyptica* de 70 à 80% lors de test de germination *in vitro* (Iasur Kruh et al, 2017)

Dans l'article de Gibot-Leclerc et Guinchard et al, 2022 il a été démontrée, par des tests de germination *in vitro* sur *P. ramosa*, que la germination de ses graines pouvait être inhibée par des isolats fongiques. Une grande diversité de mécanismes d'actions au sein de mêmes taxons fongiques a pu être identifiée. De même que des modes d'actions similaires ont été retrouvées chez des taxons différents. (Gibot-Leclerc et al, 2022).

Des études menées sur l'interaction entre *Striga hermonthica* et le sorgho indiquent que le microbiome du sol étudié contribuerait à la réduction de l'infection de striga sur les racines de son hôte. Le microbiome aurait non pas réduit le taux de germination de la plante parasite mais réduit la formation d'haustorium (Kawa et al, 2024).

Par la suite l'article Martinez et al, 2024 a poussé l'étude plus loin et a mis en lumière la présence de sols réduisant les infections de *P. ramosa* sur *B. napus* alors que d'autres les favoriseraient. Deux terrains ont été identifiés comme étant soit suppresseur soit activateur du parasitisme par *P. ramosa*. Le champ identifié comme "suppresseur" provoquait un retard de développement du parasite lors de culture directement sur le terrain ou bien en conditions contrôlées. De plus des symptômes nécrotiques apparaissaient sur le tubercule du parasite. La diversité microbienne des deux sols a été étudiée. Une relative similitude d'un point de vue diversité bactérienne a été observée alors qu'une diversité assez contrastée a été constatée pour les communautés fongiques. Les deux sols induisaient la germination des graines de la plante parasite et la formation de l'haustorium. Toutefois le sol dit "suppresseur" impactait à posteriori la survie de la plante parasite. Les conditions culturales, géographiques et climatiques étant identiques la cause supposée de cette variabilité serait les microbiotes respectifs de ces deux sols. La conclusion issue de l'article est qu'il y aurait une activité suppressive post-accrochage potentiellement provoquée par l'activité nécrotique d'un champignon (Martinez et al, 2024).

III-LE STAGE

Ces observations soulèvent les problématiques suivantes : Quel est l'impact du microbiote sur les exsudats racinaires d'*Arabidopsis thaliana* ? Et quelles conséquences ces

exsudats ont-ils sur la germination de *P. ramosa* et sur son interaction avec son hôte ?

Ce stage participe à l'avancée des connaissances sur la plante parasite *P. ramosa* et plus précisément sur l'interaction tripartite entre *P. ramosa*, son hôte et le microbiote rhizosphérique. Les résultats contribueront à élaborer une feuille de route pour contrôler l'infestation d'orobanche en condition *in vitro*, avec de potentielles applications sur le terrain à l'avenir.

Afin de répondre au mieux à cette problématique deux missions complémentaires m'ont été confiées. J'ai tout d'abord dû réaliser un criblage sur une sélection de souches bactériennes, choisies pour leur potentielle activité myrosinase. Et dans un second temps j'ai étudié l'impact de l'ajout d'un microbiote artificiel, via des inoculations de macérats de sol ou de souches microbiennes, sur les exsudats d'*A. thaliana* et son interaction avec *P. ramosa*. Plusieurs tâches distinctes composaient ce stage :

- Criblage bactérien afin d'optimiser leur utilisation lors des inoculations et de mieux comprendre leur fonctionnement.
- Mise en place d'un système de culture d'*A. Thaliana* permettant la récupération d'exsudats racinaire
- Préparation et réalisation d'inoculations du système de culture à partir de macérats et de souches bactériennes
- Réalisation de test de germination *in vitro* sur *P. ramosa* à partir des exsudats récupérés

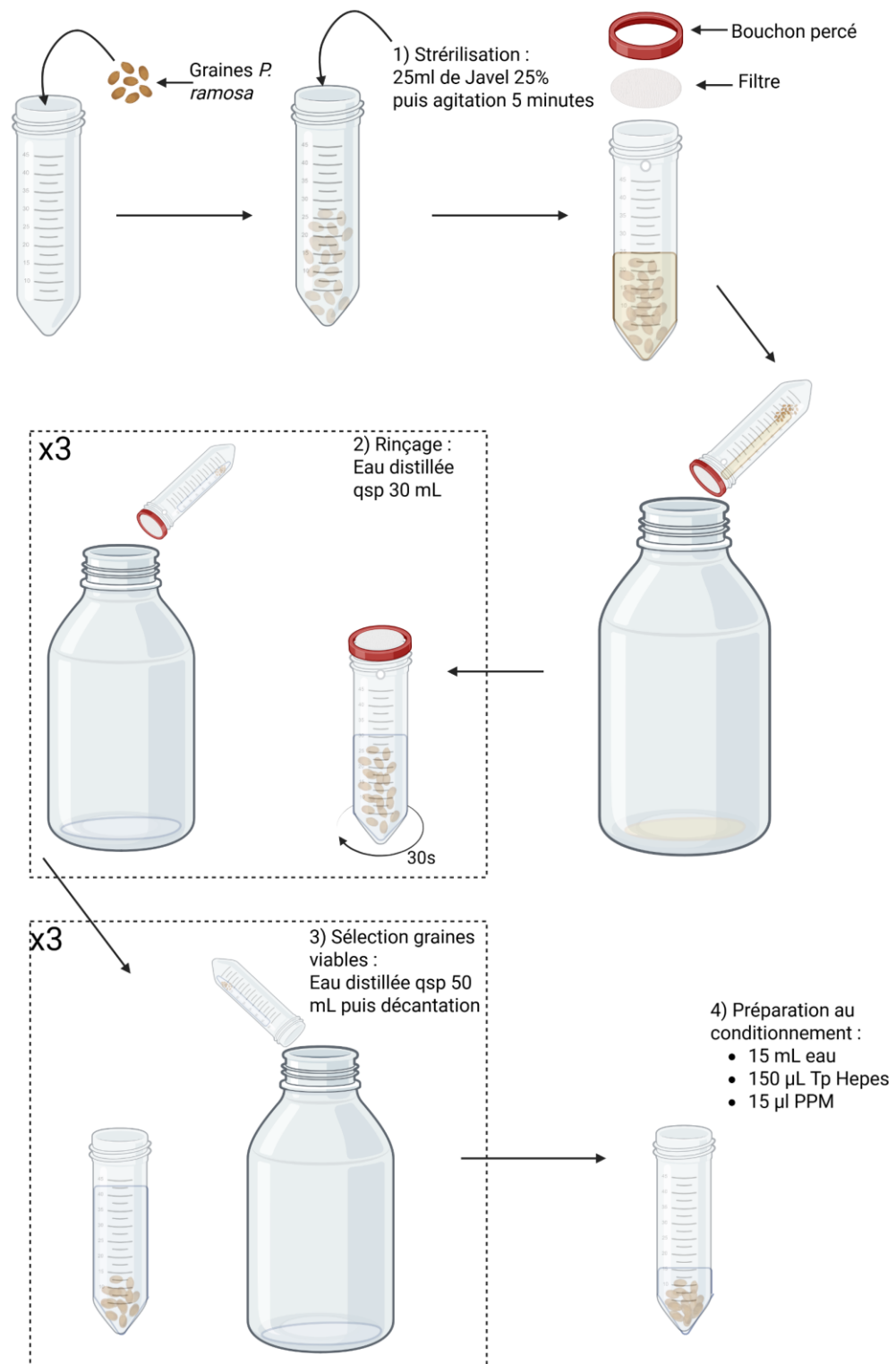


Figure 3 : : Protocol de stérilisation des graines de *P. ramosa* d'après Pouvreau et al, 2013 (Leuginer Nantes 2025)

MATERIEL(S) ET METHODES

I-MATERIEL BIOLOGIQUE

1-Matériel végétal

1.1-*Phelipanche ramosa*

Les graines utilisées pour les tests en plaque sont des *P. ramosa* (Pram127, génotype 1, Stojanova et al, 2019). Les graines ont été préalablement tamisées avec un tamis de 180-224 µm puis conservées dans l'obscurité à 25°C jusqu'à leur utilisation. Les graines ont été stérilisées en surface selon le protocole de Pouvreau et al. (2013), voir Figure 3. Pour cela 150 mg à 160 mg de graines sont récupérés dans un tube Falcon de 50 ml dans lequel sont ajoutés 25 ml de javel 25%. Le tube est agité pendant 5 minutes afin de stériliser la surface de la totalité des graines. Avant la fin des 5 minutes un bouchon percé ainsi qu'un filtre sont déposés sur le tube. Un trou est ensuite réalisé dans le haut du tube, au niveau du "50" de l'échelle de graduation grâce à une pince chaude. Cela permet de vider le liquide tout en y maintenant les graines. Trois rinçages successifs sont réalisés en ajoutant 30 ml d'eau distillée puis en mélangeant avant de vider le liquide et de recommencer. Les graines sont transvasées dans un nouveau tube Falcon. Un rinçage supplémentaire, permettant également la sélection des graines viables, est réalisé. Pour cela de l'eau jusqu'à 50 ml est ajoutée puis laissé poser le temps que toutes les graines viables tombent au fond du tube. Le liquide est lentement vidé emmenant avec lui les graines non viables pour ne conserver que celles aptes à germer. L'opération est répétée 3 fois. Une fois fini les graines sont mises dans de l'eau distillée de façon à atteindre 15 ml puis 150 µl de tampon Hepes (Acide 4-(2-hydroxyéthyl)-1-pipérazine éthane sulfonique) 0,1 M pour stabiliser le pH ainsi que 15 µl de PPM 0.1% (Plant Preservative Mixture) qui est un biocide. Les graines sont ensuite conservées à 21°C dans l'obscurité pendant 1 semaine. Après cela le milieu est changé en vidant l'ensemble du liquide puis entre 4 et 5 ml d'agarose 0,1% sont ajoutés, permettant de maintenir les graines en suspension dans le liquide et ainsi favoriser leur dépôt dans les plaques 96 puits lors des tests. Puis l'eau distillée, le tampon Hepes 0,1 M et le PPM 0,1% sont rajoutés dans les mêmes proportions que précédemment.

1.2 - *Arabidopsis thaliana*

Les plantes utilisées pour le système sont des *A. thaliana* de l'écotype sauvage avec le fond génétique Colombia (Col-0). Dans un premier temps les graines ont été stérilisées. Pour cela environ 10 mg de graines conservées à 4°C sont mises dans un tube Eppendorf. Puis 500 µl d'une solution de stérilisation est ajoutée. Cette solution est composée de 35 mL d'éthanol 100% ainsi que de 25 µl de TX/100 20% puis le tout complété jusqu'à 50 mL. Les graines sont laissées 5 minutes à incuber tout en veillant à ce que l'ensemble soit bien en contact avec la solution. Au bout de ce temps, avec une pipette le liquide est retiré et remplacé par 500 µl d'éthanol 100%. Le tout est vortexé puis le liquide est de nouveau retiré à la pipette. L'opération est répétée une seconde fois puis l'ensemble est laissé à sécher sous le PSM.

Afin d'obtenir des plantules, les graines ont ensuite été mises à germer sur boîte de pétri avec un milieu MS/MES complété par 0.6 % (pt/vol) d'agar à 21°C pendant 2 semaines avec un ratio de périodicité de lumière à 16:8.

ID	Nom complet	Phylum	Famille	Origines	Référence
G20-18	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	Pseudomonadota	Pseudomonadaceae	Épiphyte ou endophyte de tissus végétaux	Großkinsky et al, 2016
R11	Root11	Firmicutes	Bacillaceae	Épiphyte ou endophyte de racines	Vannier et al, 2023
R1277	Root1277	Proteobacteria	Caulobacteracea	Épiphyte ou endophyte de racines	Vannier et al, 2023
R179	Root179	Proteobacteria	Xanthomonadaceae	Épiphyte ou endophyte de racines	Vannier et al, 2023
R630	Root630	Proteobacteria	Xanthomonadaceae	Épiphyte ou endophyte de racines	Vannier et al, 2023
R920	Root920	Firmicutes	Bacillaceae	Épiphyte ou endophyte de racines	Vannier et al, 2023
UCMB 5113	<i>Bacillus amyloliquefaciens subsp. plantarum</i>	Firmicutes	Bacillaceae	Sol de montagne	Asari et al, 2016
WYE1	<i>Citrobacter</i> WYE1	Pseudomonadota	Enterobacteriaceae	Sol d'un champ cultivé pour le colza	Albaser et al, 2016

Tableau 1 : Description des souches bactériennes utilisées pour le criblage

2-Sol

2.1- Substrat pour le système de culture miniaturisé

Le sol utilisé pour ses propriétés favorisant la germination de *Phelipanche ramosa* a été échantillonné dans une commune voisine de Niort (Sainte-Ouenne, 79220, France) en 2022. Il est conservé à l'obscurité à température ambiante. Un tamisage à 1 mm a été réalisé pour limiter les particules trop imposantes lors de son utilisation.

2.2-Macérats de sol pour inoculation

Dans l'optique d'inoculer le substrat du système ExuFlow avec des macérats de sol contenant des communautés microbiennes susceptibles d'avoir un impact sur les exsudats racinaires d'*A. Thaliana*, 5g de sol STO a été mis à macérer dans 5 mL d'eau distillée pendant 24h à 21°C dans l'obscurité et sous agitation à 400 rpm.

Ensuite, les macérats ont été centrifugés 5 minutes à 500rpm puis filtrés à 0,7 µm afin d'enlever un maximum de particules du sol.

3-Bactéries

3.1-Criblage

Pour réaliser un premier criblage nous avons utilisé 8 souches bactériennes (Tableau 1). Cinq d'entre-elles ont été choisies d'après les articles Vannier et al, 2023 et Chroston et al, 2024, et d'après leurs données génomiques pour leur activité myrosinase potentielle. Les 3 autres souches ont été décrites pour leur activité PGPR (plant growth promoting rhizobacteria) et notamment via la production de cytokinines (Großkinsky et al, 2016 ; Albaser et al 2016 et Asari et al, 2017). Les bactéries ont été cultivées sur milieu LB-Agar et incubées à 30°C pendant 1 nuit dans un premier temps pour s'assurer de leur pureté. Puis une colonie a été transférée dans 4ml de milieu LB liquide sous agitation à 400 rpm à 30°C.

3.2- Inoculations

Dans le même objectif que les macérats des inocula de bactéries ont été réalisés à partir de bactéries conservées à -80°C. La bactérie utilisée (WYE1) est une souche du genre *Citrobacter* extraite de sol de parcelle de colza présentant une activité myrosinase et pouvant transformer les glucosinolates en isothiocyanates (Albaser et al, 2016). Dans un premier temps, la souche a étéensemencée sur milieu LB-Agar à partir de solutions stock (-80°C) et incubées 1 journée à 30°C. Ensuite, une colonie a été récupérée et inoculée dans 4 mL de LB liquide laissé à 30°C sous agitation pendant 2 jours. Le milieu a ensuite été remplacé par la solution d'arrosage du système, du TT qui est une solution nutritive appauvrie en azote et en phosphore afin de favoriser la production d'exsudats (Yoneyama et al, 2007). Puis des dilutions ont été réalisées jusqu'à l'obtention d'une DO de 0.1 au spectrophotomètre.

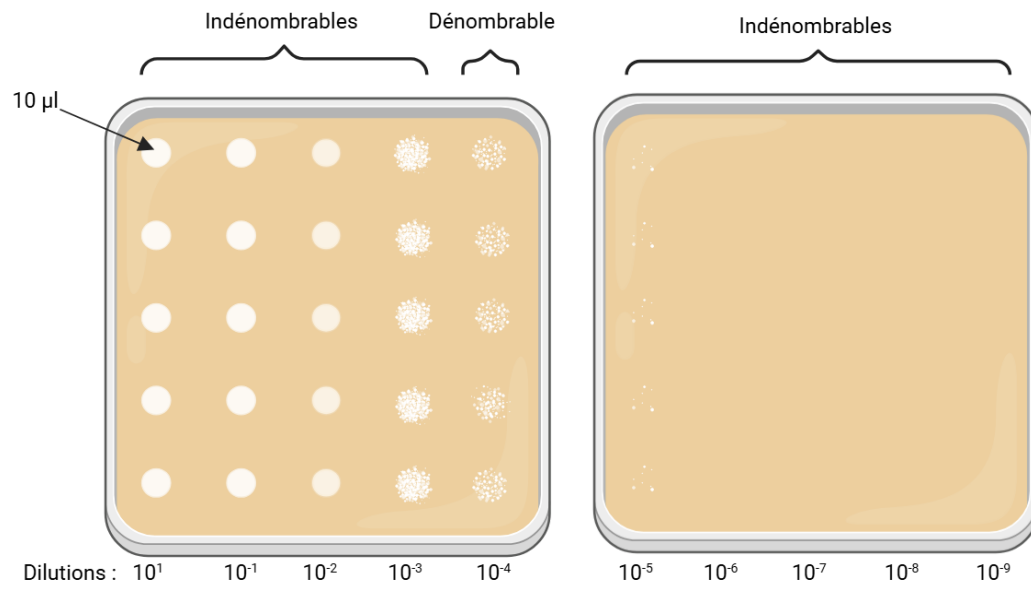


Figure 4 : Méthode de dénombrement des colonies bactériennes (Leuginer Nantes 2025)

II- CRIBLAGE DES BACTERIES

1-Tests biologiques

1.1-Dénombrement des colonies bactériennes

Afin de pouvoir ajuster au mieux les inoculations bactériennes il est nécessaire de connaître combien de cellules viables l'on retrouve pour la densité optique (DO) que l'on utilise, soit 0,1. Étant donné que la DO mesure la turbidité et non pas le nombre de cellules viables, cette donnée peut être impactée par la taille ou la forme des cellules (Brito et al, 2024). De plus certaines souches peuvent avoir une viabilité variable dans des conditions identiques. Dénombrer les colonies permet ainsi de créer des conditions normalisées et identiques entre les différents inoculas.

Pour réaliser ce dénombrement toutes les souches ont été diluées dans du LB liquide jusqu'à l'obtention d'une DO de 0,1 à une longueur d'onde de 600 nm. Dans un second temps des dilutions de 10^{-1} à 10^{-9} ont été réalisées pour chacune des bactéries. Sur des boîtes de pétri, avec du milieu LB Agar, 10 μ l de chacune des dilutions en partant de la concentration initiale ont été déposés en gouttes puis laissées séchées quelques minutes. Cinq réplicats techniques ont été réalisés par concentration, voir Figure 4. Les boîtes ont été parafilmées puis mises à incuber une nuit à 30°C. Le lendemain les colonies ont été dénombrées. Pour cela, une dilution parmi les 10 a été choisie. Pour cela les colonies devaient être comptables, en d'autres termes entre 5 et 50 colonies devaient être discernables pour une goutte (Di Salvo et al, 2021). Une moyenne est réalisée sur l'ensemble des colonies dénombrées pour une concentration. Enfin le nombre de CFU est obtenu d'après la formule :

$$\text{CFU/mL} = (\text{Nombre moyen de colonies par goutte} \times \text{Facteur de dilution}) / \text{Volume de la goutte (en mL)}$$

1.2 - Test glucosinolate chromogène

Ce test permet d'identifier rapidement si l'une de nos bactéries montre de l'activité myrosinase et hydrolyse le glucosinolate. Il s'agit d'un test innovant issu de l'article de Tomas et al, 2024.

Pour chacune des souches 50 μ l de GSL p-nitrophenoxy (GSL-pNP) 10^{-5} M, un glucosinolate chromogène de synthèse utilisé comme une molécule de détection de l'activité myrosinase au spectrophotomètre (Tomas et al, 2024) ainsi que 10 μ l de la souche bactérienne sont mis dans un tube Eppendorf. Pour le témoin positif 10 μ l de myrosinase 50 mU/mL sont ajoutés au 50 μ l de GSL-pNP. En ce qui concerne le témoin négatif 10 μ l d'eau distillée sont utilisés. Quatre réplicats techniques sont réalisés par conditions. Les tubes contenant le milieu réactionnel sont mis à incuber au bain marie à 37°C pendant 15 minutes. Au bout de ce temps le contenu des tubes est mis sur une plaque 96 puits. 25 μ l de Na_2CO_3 1M sont ajoutés dans chacun des puits afin de stabiliser le pH au-dessus 9 et ainsi permettre de déplacer l'absorption spectral vers 400nm, donnant un aperçu du spectre du visible, témoignant d'une activité myrosinase. L'absorbance de l'ensemble est mesurée au lecteur de microplaques BMG à une longueur d'onde de 405nm.

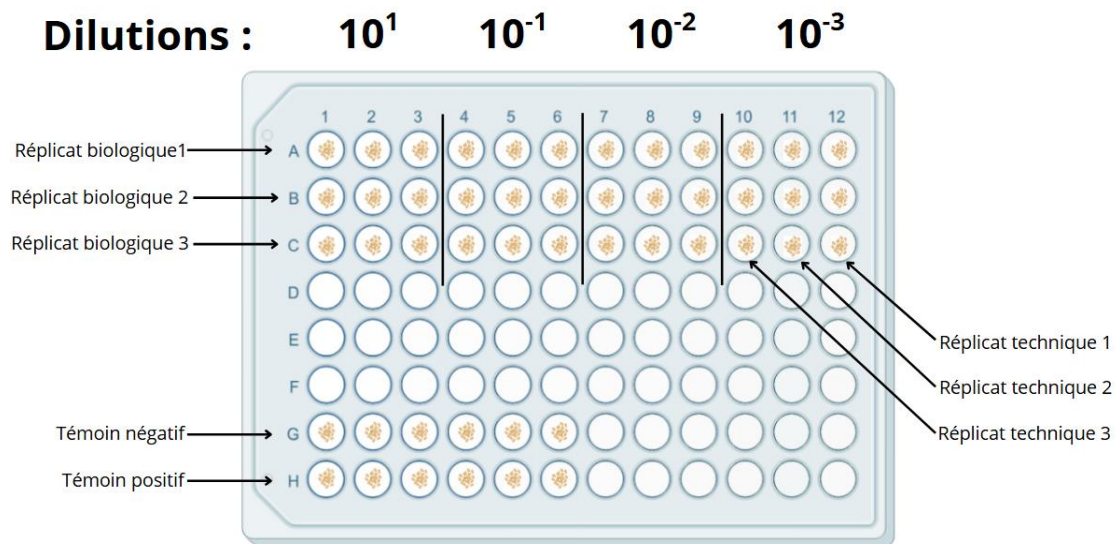


Figure 5 : Exemple de plan de plaque 96 puits pour un test (Leuginer Nantes 2025)

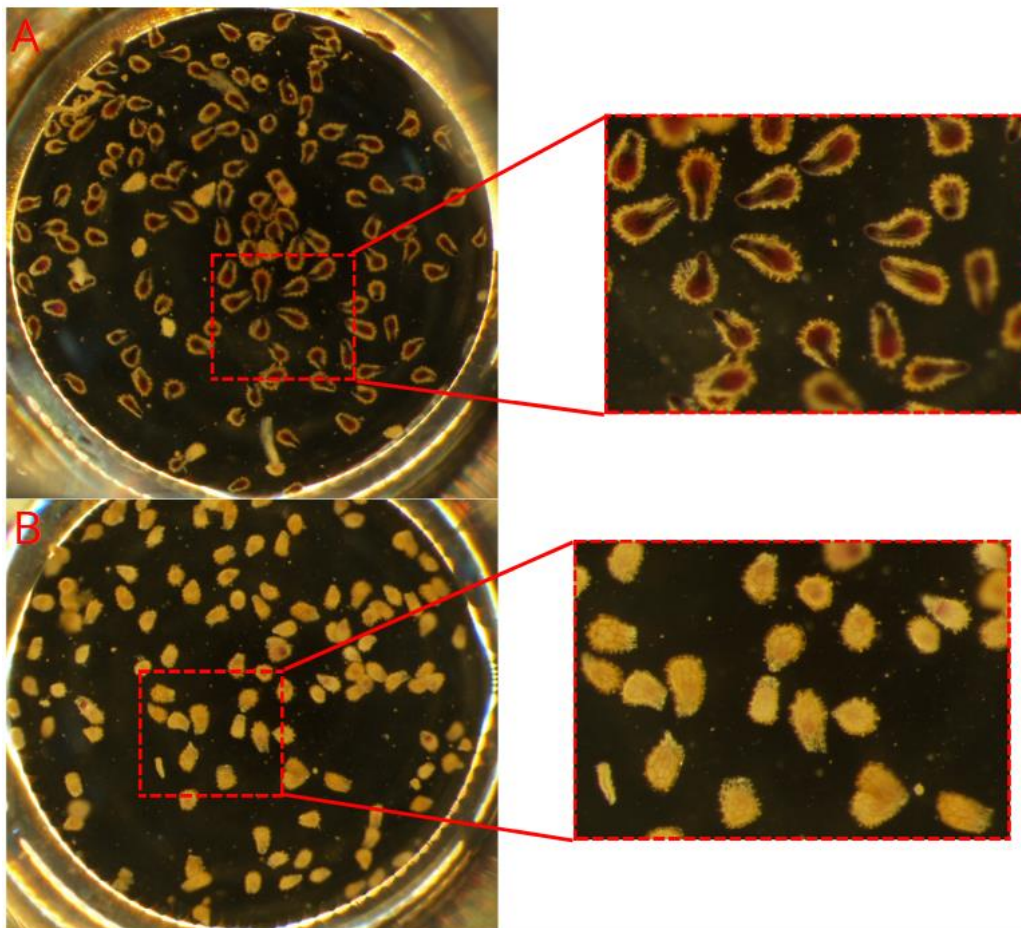


Figure 6 : Photos prises à la loupe binoculaire (x20 et x25) ; A : Graines germées ; B : Graines non germées (Leuginer Nantes 2025)

1.3- Tests de germination et d'inhibition *in vitro*

1.3.1 - Préparation des bactéries

Les différentes souches bactériennes en milieu LB liquide sont centrifugées pendant 2 minutes à 8000 rpm afin de les culotter et ainsi changer le milieu plus aisément. Le milieu de culture est remplacé par 1ml d'eau distillée. Puis les différentes cultures sont diluées, toujours dans de l'eau distillée, jusqu'à l'obtention d'une DO de 0,1.

1.3.2 - Test sur l'activité myrosinase via un test de germination sur *P. ramosa*

Pour ce test de germination (Figure 5), 40 µl de graines de *P. ramosa* conditionnées sont déposées dans une plaque 96 puits de façon à obtenir une quantité homogène de graines dans chaque puit, entre 90 et 100. Un volume de 5 µl de Gluconasturtine (GNT) 10^{-4} M est ajouté. Il s'agit d'un glucosinolate majoritaire chez le colza, pouvant être hydrolysé en 2 Phenylethyl isothiocyanate, un SG (Auger et al, 2012), par des myrosinases. Par la suite, 5 µl de la culture bactérienne sont rajoutés. On réalise 6 réplicats par souche. Deux puits par culture bactérienne sans GNT ont le rôle de témoins négatifs afin de s'assurer que la bactérie seule ne provoque pas la germination de *P. ramosa*. Trois autres témoins négatifs permettent de vérifier que :

- Les graines ne germent pas seules : témoins eau distillée,
- Le GNT ou les enzymes myrosinases ne provoquent pas de germination : témoins GNT et témoins enzymes myrosinases

Deux témoins positifs permettent de s'assurer que les graines sont viables et que les molécules de synthèses sont fonctionnelles : les témoins GR24 à 10^{-5} M, qui est une strigolactone synthétique et la gluconasturtine (GNT) 10^{-4} M avec 50 mU/mL de l'enzyme myrosinase. La plaque est ensuite celée avec du parafilm et mise à incuber pendant 3 jours à 21°C dans l'obscurité. Pour permettre la lecture de la germination 5 µl de Bromure de méthylthiazolyldiphényltétrazolium (MTT), marqueur de l'activité métabolique, ont été ajoutés à chacun des puits. Le MTT est réduit en cristaux violets par l'activité enzymatique mitochondriale. Ces cristaux sont insolubles dans l'eau mais peuvent être dissouts dans une solution d'isopropanol acidifiée. Une coloration de la solution en violet qui peut être mesurée au spectrophotomètre est obtenue (Pouvreau et al, 2013). Suite à 1 journée d'incubation supplémentaire dans les mêmes conditions les graines ayant subi une modification métabolique se colorent en violet. Il est également possible de voir apparaître la radicule chez certaines graines, voir Figure 6. Afin de déterminer le taux de germination un comptage manuel est réalisé à la loupe binoculaire. Pour cela chacun des puits de la plaque sont pris en photo puis les images sont traitées avec ImageJ afin de compter les graines avec un phénotype "graine germée" et celle avec le phénotype "graine non-germée".

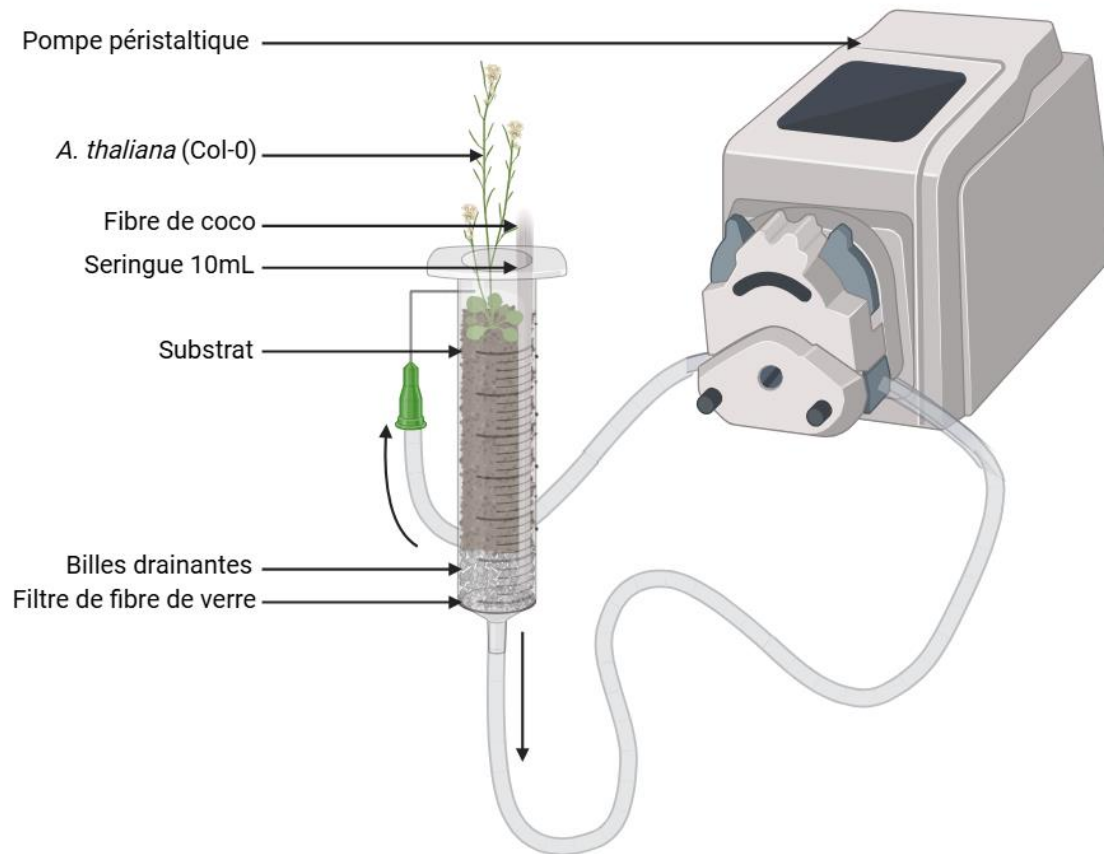


Figure 7 : Schéma du système ExuFlow (Leuginer Nantes 2025)

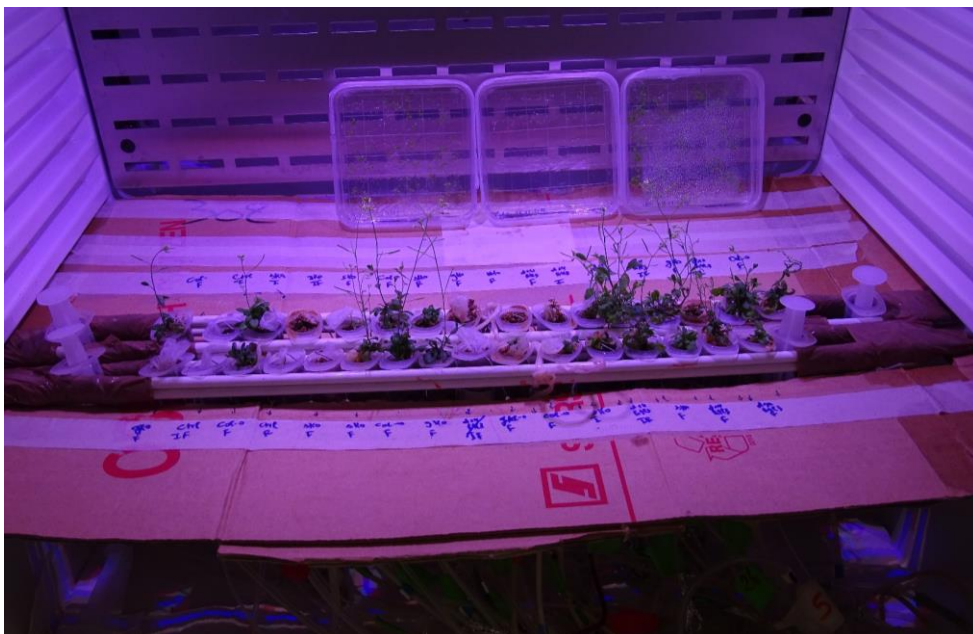


Figure 8 : Photo du système installé (Par Ahmed Choukri)

2.3.3 - Test d'inhibition

Pour le test d'inhibition, le protocole est assez similaire. Un volume de 40 µl de graines de *P. ramosa* conditionnées sont déposés dans une plaque 96 puits. 5 µl de culture bactérienne sont ajoutés en réalisant 8 réplicats par souche. Trente minutes après le dépôt des bactéries, 5 µl de GR24 10⁻⁵M sont ajoutés par puit. Pour les témoins positifs de l'inhibition, 5 µl de thidiazuron (TDZ) 10⁻⁴M, un analogue de la cytokinine (Goyet et al, 2017), sont ajoutés, ainsi que 5 µl de GR24 10⁻⁵M pour les témoins négatifs. Deux puits supplémentaires par souche bactérienne sont dédiés à des témoins négatifs pour s'assurer que la bactérie seule n'affecte pas les graines. La plaque est celée avec du parafilm et mise à incuber pour 4 jours à 21°C dans l'obscurité. Au bout de ce laps de temps les graines sont teintées par du MTT avec 1 nuit d'incubation. Le lendemain le comptage des graines est réalisé manuellement.

III- CULTURE D'ARABIDOPSIS THALIANA DANS UN SYSTEME MINIATURISE AVEC RECIRCULATION CONTINUE DU MILIEU (EXUFLOW)

1-Système de culture miniaturisé

1.1- Mise en place

Afin de pouvoir étudier dans des conditions contrôlées l'impact des communautés microbiennes, synthétiques ou non, sur les exsudats d'*A. thaliana* un système de culture miniaturisé avec une recirculation continue de la solution de culture (ExuFlow) a été mis en place avant mon arrivée par Ahmed Choukri, doctorant au sein de l'équipe Rhizoplane de L'US2B, voir Figures 7 et 8. Ce système est composé de 32 seringues de 10mL reliées indépendamment les unes des autres à un tuyau de sortie et à un tuyau d'entrée par lesquels la solution de culture circule grâce à une pompe péristaltique. Dans chaque seringue se trouve un filtre de fibre de verre, des billes drainantes, un film de fibre de coco pour favoriser l'irrigation et un substrat de culture. L'ensemble des seringues ont été autoclavées avant leur mise en place. Le système de culture a par la suite été mis en place dans un incubateur à 21°C, avec 8h de nuit et 16h de jour. Le système fonctionne sur 4 semaines avec une récupération des exsudats hebdomadaire. L'arrosage est continu grâce à la pompe péristaltique. Les jeunes plantules Col-0 sont installées deux jours après la mise en place du système. Deux types de substrats ont été utilisés pour le système : i/ le sol naturel provenant de Saint-Ouenne (STO) et ii/ un mélange artificiel inerte (I) composé de 50% de terreau et de 50% de vermiculite, autoclavé avant utilisation. L'intérêt de la matrice inerte est qu'elle permet de tester des souches, des communautés microbiennes en s'affranchissant de la structure physique et pédochimique du sol. Les différentes conditions étudiées sont décrites dans la Figure 9. Les inoculations sont réalisées soit une fois en semaine 1 (W1) soit deux fois, une première fois en semaines un et deux (W1 et une seconde fois en W2). Pour cela 1 ml de la solution est distribuée avec une seringue, comme lors des arrosages.

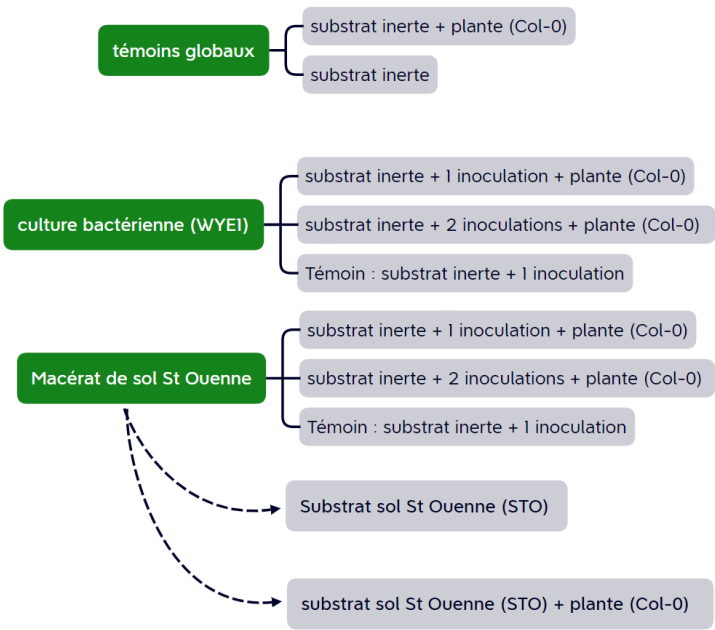


Figure 9 : Récapitulatif des conditions testées avec le système ExuFlow (Leuginer Nantes 2025)

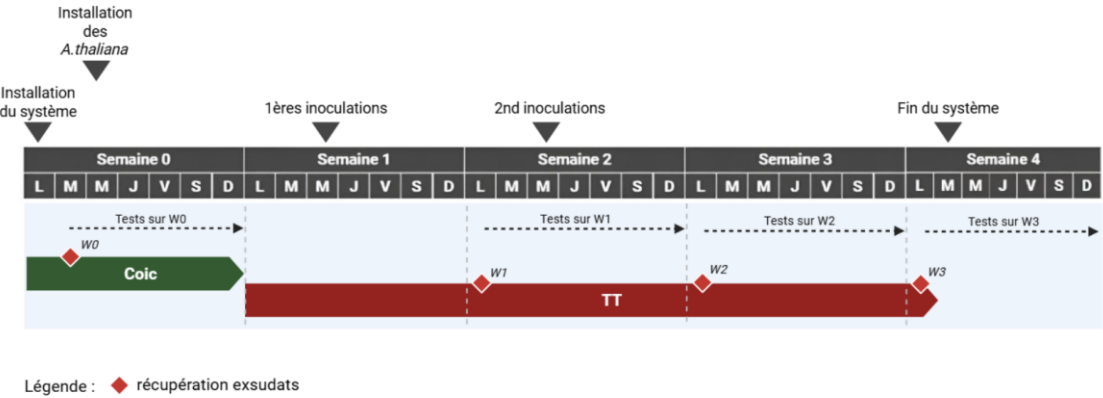


Figure 10 : Planning de culture du système ExuFlow (Leuginer Nantes 2025)

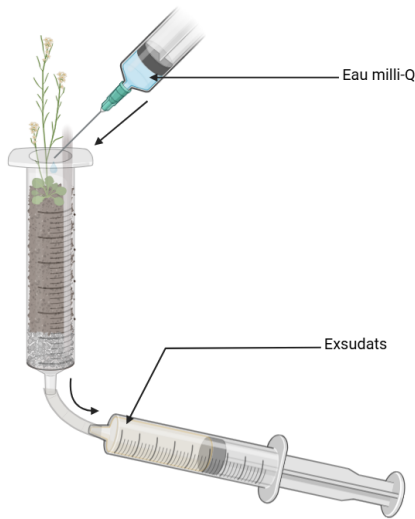


Figure 11 : Schéma du mécanisme de récupération des exsudats sans pompe péristaltique (Leuginer Nantes 2025)

Les plantes sont arrosées tout au long de semaine W0 avec une solution enrichie en micro- et macro-éléments afin de favoriser l'installation du système racinaire. Puis à compter de la semaine suivant le repiquage des *A. thaliana*, W1, jusqu'à la fin du fonctionnement du système les plantes sont arrosées avec la solution carencée TT, voir Figure 10.

1.2- Récupération des exsudats

La récupération des exsudats se fait de façon hebdomadaire. Pour cela le tuyau est débranché au niveau de la sortie, soit au niveau de l'aiguille. Il est alors reconduit vers un tube de 25 mL dans lequel les exsudats peuvent être récupérés. L'arrosage de la plante se fait manuellement à l'aide d'une seringue avec de l'eau milli-Q jusqu'à l'obtention d'environ 7 mL d'exsudats. L'ensemble des exsudats sont ensuite filtrés à 0,22 μm afin de les stériliser puis conservés à 4°C jusqu'à la réalisation des tests.

Une méthode manuelle a également dû être utilisée durant le fonctionnement du système. Pour cela les exsudats sont récupérés directement à l'aide d'une seringue que l'on était venu placer sous le tube de culture (Figure 11)

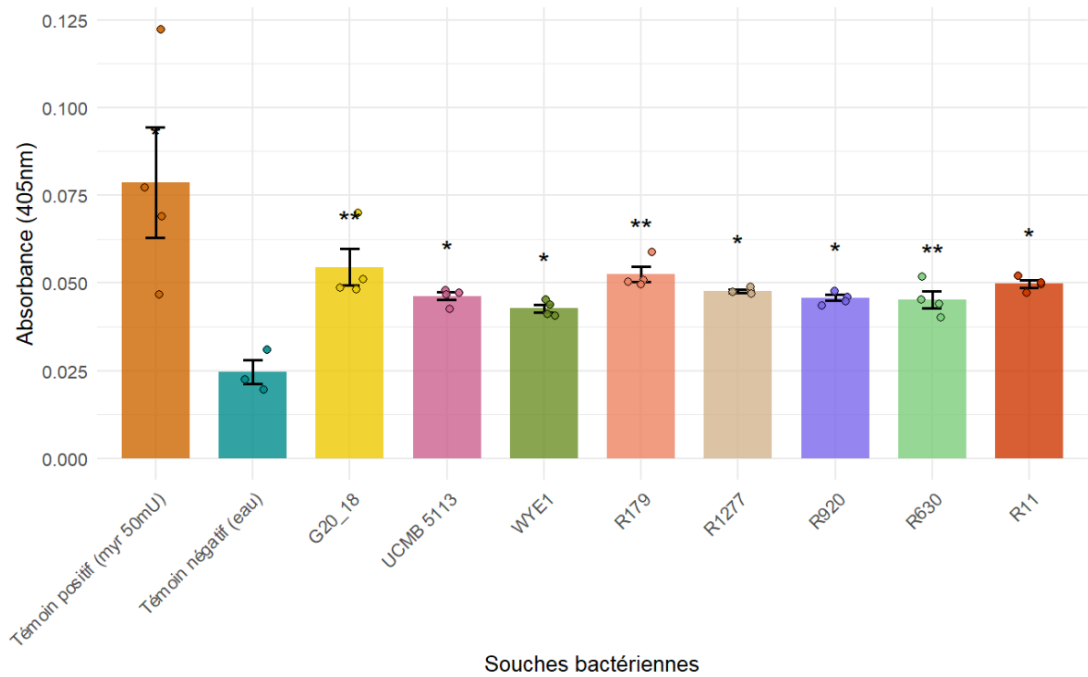
2-Les tests de germinations sur les exsudats

Pour vérifier l'impact des différentes conditions sur la germination de *P. ramosa* des tests de germination en plaques sont réalisés comme expliqué au point 2.3.2. Un volume de 45 μL de graines de *P. ramosa* conditionnées sont déposées dans chacun des puits de la plaques. En parallèles les exsudats récupérés sont dilués en cascade de 10^1 à 10^{-3} dans l'eau distillée. Puis 5 μL sont ajoutés aux graines. Trois réplicats techniques sont réalisés par condition pour chaque réplicat biologique. Les contrôles sont réalisés avec l'ajout de 5 μL d'eau distillée pour le témoin négatif et de 5 μL de GR24 pour le témoin positif. Les plaques sont ensuite mises à incuber pendant 3 jours à 21°C dans le noir. Afin de colorer les graines germées, 5 μL de MTT sont ajoutés dans chacun des puits. Après une journée d'incubation du tampon de lyse permettant de dissoudre les cristaux est ajouté. Après 24h supplémentaires l'absorbance de chacun des puits peut être obtenue.

Les données ont été traitées avec un test GLM, qui est un modèle linéaire généralisé. Les données montrant une distribution non normale, due aux importantes variations entre les différents réplicats biologiques, il a fallu supposer une distribution type sur laquelle réaliser nos tests. Suite à différents essais nous avons pu identifier que la distribution la plus adéquate aux données était la distribution gamma. La moyenne ajustée est calculée pour l'ensemble des conditions puis des comparaisons multiples entre toutes les conditions sont appliquées. Des boxplots sont finalement choisis pour visualiser les résultats.

Bactéries	moyenne des colonies	Volume (mL)	Dilution	CFU/mL
R630	14,2	0,01	10 ⁻⁵	1,42 × 10 ⁸
R1277	19	0,01	1	1,9 × 10 ³
R11	19	0,01	10 ⁻⁵	1,9 × 10 ⁸
R179	38,2	0,01	10 ⁻⁸	3,82 × 10 ¹¹
R920	22,4	0,01	10 ⁻⁴	2,24 × 10 ⁷
UCMB 5113	62,2	0,01	10 ⁻³	6,22 × 10 ⁶
G20 18	17	0,01	10 ⁻⁵	1,7 × 10 ⁸
WYE1	30,6	0,01	10 ⁻⁸	3,06 × 10 ¹¹

Tableau 2 : Résultats du dénombrement des colonies présentes par souches bactériennes après calibrage à une DO₆₀₀ de 0,1



Graphique 1 : Barplot de l'activité myrosinase d'après les mesures d'absorbance (A_{405}) en fonction de la souche bactérienne. Analyse statistique avec un test de Welch par rapport au témoin négatif ($p < 0,05$ (*) ; $p < 0,01$ (**) ; indiquent une différence significative)

RESULTATS

I-CRIBLAGE DE BACTERIES

1-Tests biologiques

1.1-Dénombrement des colonies bactériennes

Le dénombrement des bactéries a pu être réalisé dès le lendemain de l'ensemencement. Le Tableau 2, représente les comptages pour les différentes souches bactériennes étudiées avec la dilution à laquelle il a été possible de dénombrer les colonies, ainsi que le nombre moyen de colonies comptées sur les 5 réplicats techniques de la dilution en question. Les deux dernières colonnes indiquent respectivement l'origine naturelle de la souche bactérienne et la concentration en unités formant colonies par millilitre (CFU/mL).

Le seuil de dilution à partir duquel les colonies sont discernables et comptables variait fortement d'une souche à une autre. La plupart étaient indénombrables sur plusieurs dilutions atteignant parfois la dilution 10^{-8} , comme cela a été le cas pour les souches R179 et WYE1. Tandis que d'autres ont pu être dénombrées dès la concentration initiale comme c'est le cas avec la souche R1277. Par conséquent les valeurs de CFU/ml diffèrent grandement d'une souche à une autre.

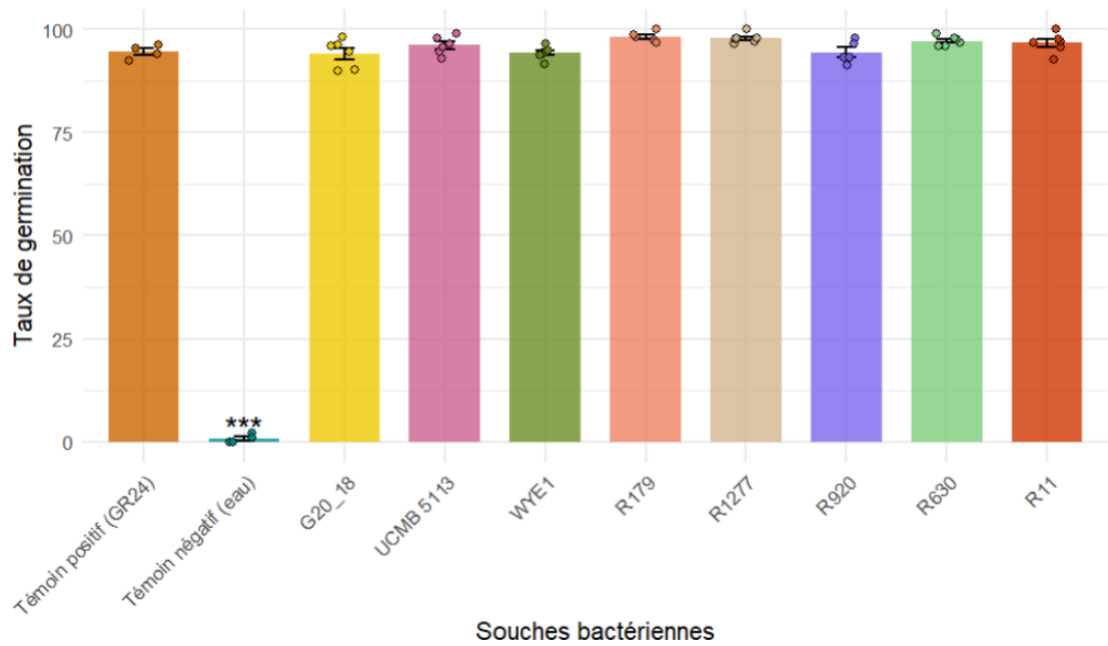
L'ensemble des cultures bactériennes ayant été calibrée à une DO identique de 0,1, ces variations indiquent une grande hétérogénéité entre les souches, notamment en termes de morphologie et de taille cellulaire.

1.2-Test glucosinolate chromogène

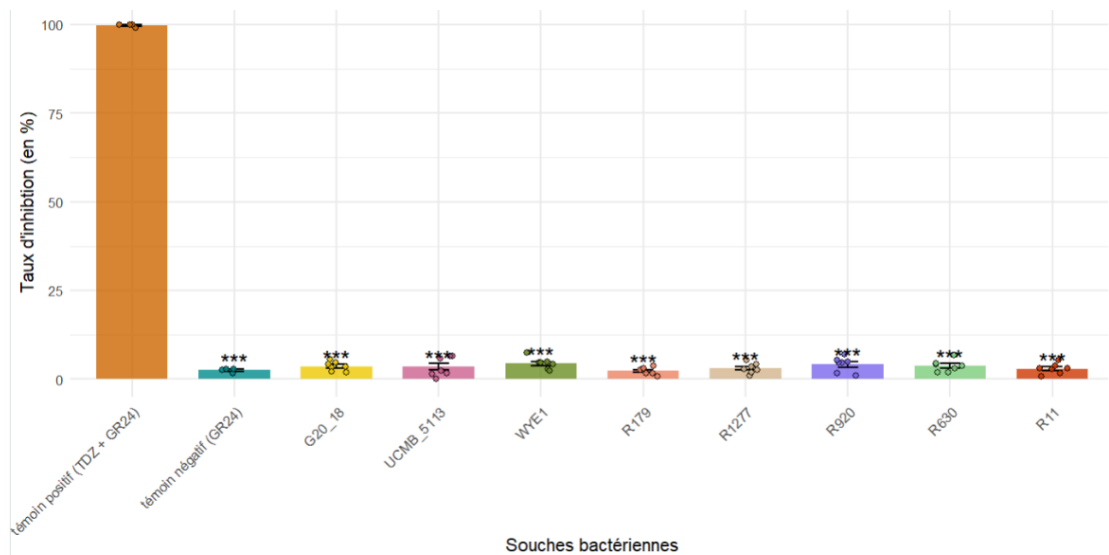
Le test glucosinolate chromogène a été réalisé sur l'ensemble des bactéries décrites dans le Tableau 1. Les résultats sont illustrés dans un diagramme en barres, voir Graphique 1, qui met en évidence les différences d'activité myrosinase entre les souches, à partir des valeurs d'absorbance mesurées.

Ce test repose sur la libération de pNP (para-nitrophénol) lors de l'hydrolyse du GSL-pNP par les enzymes myrosinase. En milieu basique, le pNP libéré colore la solution en jaune, et l'intensité de cette coloration est directement proportionnelle à la quantité de pNP produite (Tomas et al, 2024).

Ce graphique permet également de visualiser la significativité des résultats. Un test de Welch a été appliqué aux données. Ces dernières ne présentaient pas une distribution suffisamment normale pour utiliser un test de type ANOVA. Le test de Welch permet donc de comparer les moyennes des différents groupes par rapport à notre témoin négatif, (eau distillée), sans supposer que les variances soient égales. L'ensemble des souches bactériennes montre une différence significative (p -value < 0.05) avec le témoin négatif. Cela confirme la présence d'une activité myrosinase chez l'ensemble des souches testées. On observe également que l'expression de cette activité est assez similaire entre les souches, avec des valeurs assez proches. Ces dernières ne sont toutefois pas aussi importantes que le témoin positif.



Graphique 2 : Taux de germination moyen de graines de *P. ramosa* en fonction des différentes souches bactériennes ($DO_{600} = 0,1$) obtenu après dénombrement des graines germées. Analyse statistique par ANOVA suivie d'un test de Dunett par rapport au témoin positif ($p < 0,001$; *** indique une différence significative)



Graphique 3 : Taux d'inhibition moyen de graines de *P. ramosa* en fonction des différentes souches bactériennes ($DO_{600} = 0,1$) obtenu après dénombrement des graines inhibées. Analyse statistique par ANOVA suivie d'un test de Dunett par rapport au témoin positif ($p < 0,001$; *** indique une différence significative)

1.3-Tests de germination et d'inhibition *in vitro*

1.3.1 - Test de germination

Les résultats du test de germination sont représentés dans le Graphique 2, Ce diagramme en barre affiche le taux de germination moyen en pourcentage en fonction de la souche bactérienne utilisée. Une ANOVA suivie d'un test post-hoc de Dunnett ont été réalisés et indiquent qu'il n'y a aucune différence significative entre le témoin positif et les différentes conditions (p -value > 0.05). Les différentes souches bactériennes induisent bel et bien la germination de *P. ramosa* en présence de GNT comme l'avait laissé imaginer le test glucosinolate chromogène.

1.3.2 - Test d'inhibition

Les résultats du test d'inhibition sont présentés dans la figure correspondante, voir Graphique 3. Ce diagramme met en avant le taux moyen, exprimé en pourcentage, de graines dont la germination a été inhibée pour chaque condition.

Les graines exposées aux souches bactériennes ont germé et ne présente pas d'inhibition de germination comme mesuré sur le témoin positif d'inhibition (voir Figure 6). L'ensemble des souches bactériennes montrent une différence significative (ANOVA, post-hoc Dunnett, p -value $< 0,05$) par rapport au témoin positif. L'ensemble des souches donnent des résultats identiques au témoin négatif (eau distillée) (ANOVA, post-hoc Dunnett, p -value $> 0,05$). Il n'y a donc pas d'inhibition de la germination de *P. ramosa* provoquée par ces souches bactériennes aux doses testées.

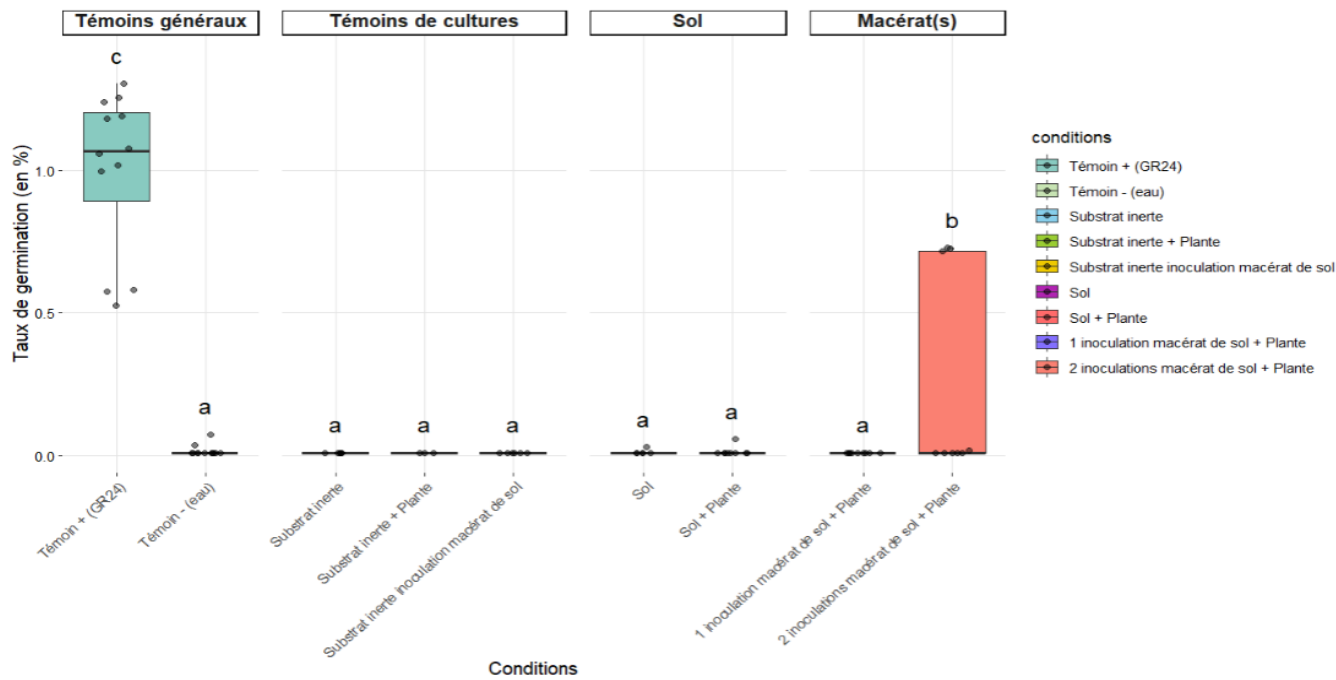
II-CULTURE D'*ARABIDOPSIS THALIANA* DANS UN SYSTEME MINIATURISE AVEC RECIRCULATION CONTINUE DU MILIEU (EXUFLOW)

1-Les tests de germinations sur les exsudats

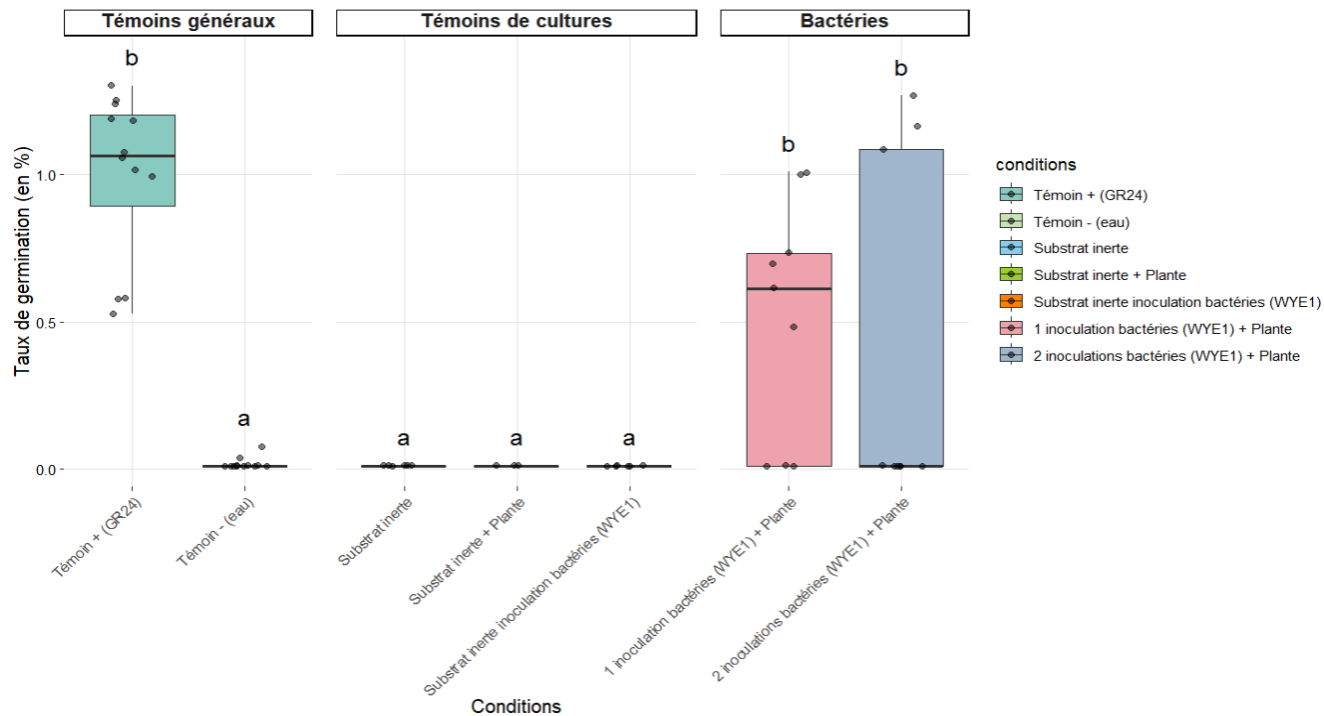
Des tests de germination *in vitro* sur *P. ramosa* ont été réalisés sur l'ensemble des exsudats récupérés tout au long des 4 semaines de cultures. En W0, soit avant l'installation des *A. thaliana*, seuls les échantillons contenant le sol "STO" ont été échantillonnés étant donné que l'ensemble des autres conditions étaient supposées stériles. Puis en W1, soit après l'installation des *A. thaliana* et la première inoculation des macérats de sol et des cultures bactériennes, l'ensemble des conditions ont été échantillonnées avec 6 réplicats biologiques pour les deux différentes catégories d'inoculations. Enfin en W2 et W3, la moitié des conditions ayant reçus une inoculation en reçoivent une deuxième créant deux nouvelles conditions :

- Col-0 2 inoculations macérat STO
- Col-0 2 inoculations bactéries (WYE1)

Une fois encore l'ensemble des conditions sont échantillonnées.



Graphique 4 : Boxplot du taux de germination de *P. ramosa* en W3 avec inoculation de macérats de sol. Données obtenues par extrapolation de la mesure d'absorbance ($A_{570-630}$). Une analyse statistique a été réalisée à l'aide d'un test GLM ($p < 0,05$)



Graphique 5 : Boxplot du taux de germination de *P. ramosa* en W3 avec inoculation de la souche bactérienne WYE1. Données obtenues par extrapolation de la mesure d'absorbance ($A_{570-630}$). Une analyse statistique a été réalisée à l'aide d'un test GLM ($p < 0,05$)

Les tests de germination sur les exsudats des semaines W0, W1 et W2 n'ont montré aucune germination de *P. ramosa* que ce soit en présence du contrôle négatif (eau distillée) ou bien des exsudats récupérés des différentes conditions du système de culture.

Un impact significatif sur la germination n'est observable qu'à partir de la semaine W3, voir Graphiques 4 et 5. Trois modalités montrent une germination significativement positive après 3 semaines de culture :

- Col-0 2 inoculations macérat STO
- Col-0 1 inoculation bactéries (WYE1)
- Col-0 2 inoculations bactéries (WYE1)

Une grande variabilité sur l'ensemble des réplicats biologiques et techniques pour chaque modalité est toutefois observable. Il est important de préciser que nous avons rencontré divers problèmes techniques avec le système de culture durant son mois de fonctionnement qui ont pu impacter les analyses. Il y a eu une perte régulière d'exsudats lié à des tubes bouchés provoquant parfois des ruptures dans l'assemblage des tuyaux. La pompe a également cessé de fonctionner au cours du mois, au tout début de la 3ème semaine de culture. L'arrosage a donc dû être réalisé de façon manuelle quotidiennement. La récupération a également dû être modifiée et a été réalisée à l'aide d'une seringue comme l'explique la Figure 11.

DISCUSSION

I-CRIBLAGE DE BACTERIES

1-Tests de germination et d'inhibition

Les résultats obtenus suite aux tests de germination et d'inhibition donnent une vision très binaire de l'action de ces souches bactériennes. En effet toutes les souches induisent la germination de 96 à 98% des graines de *P. ramosa* en présence de GNT. Et entre 1 et 4% des graines de *P. ramosa* lors du test d'inhibition. Dans cette étude les souches ont toutes été utilisées en concentrations saturantes. Cette approche ne permet pas de faire de distinctions entre les différentes actions des bactéries criblées. Il pourrait être intéressant pour des travaux futurs de réaliser des séries de dilutions de nos souches afin d'obtenir des réponses plus fines de nos tests. Il serait également envisageable de réaliser un calibrage de nos souches en fonction de la valeur de CFU/mL. Nous avons pu constater d'importantes différences entre les souches lors du dénombrement, témoignant de fortes variabilités de vitesses de croissance, de capacité à former des colonies viables ou bien juste phénotypiques. Réaliser des tests de germination ou d'inhibition en prenant cette variabilité en compte permettrait une vision plus réaliste de leurs actions.

Outre le manque de nuances de notre criblage, nous avons également négligé, par manque de temps, d'autres activités biologiques. En effet, l'absence de germination des graines de *P. ramosa* n'est pas la seule réponse possible. Le préhaustorium dont la formation est notamment induite par les cytokinines peut être inhibée, réduisant alors l'attachement des parasites à l'hôte. Cela a été démontré suite à l'application de (\pm) -catéchines, des flavonoïdes naturels, à du sol (Veronesi et al, 2024). La longueur de la racine peut également être réduite, pouvant alors empêcher la fixation du parasite aux racines de son hôte. Lors de l'utilisation de p-benzoquinones sur des racines d'orobanche, une réduction significative de leur croissance a pu être constatée. Un effet nécrotique significatif sur les racines a également pu être observé suite à l'utilisation de 2,6-diméthoxy-p-benzoquinone chez *Striga* (Fernández-Aparicio et al, 2021).

Les tests menés durant ce stage ne permettent pas de visualiser l'ensemble des fonctions inhibitrices de ces bactéries. Néanmoins il a parfois été possible d'observer des débuts d'haustoriogénèse lors des tests d'inhibition, voir Figure 12.

2-Caractère innovant des approches expérimentales

L'une des missions principales de ce stage était de cribler des communautés microbiennes pouvant impacter le métabolome d'*A. thaliana*, impliqué notamment dans les étapes précoces du cycle biologique de *P. ramosa*. Nous avons utilisé *A. thaliana* en sachant que la voie métabolique impliquée pour la germination de *P. ramosa* la plus importante est celle des glucosinolates/isothiocyanates. L'objectif de cette approche était de tester l'effet des microorganismes sélectionnés sur les étapes précédant l'accrochage du parasite : l'induction et l'inhibition de la germination. L'activité myrosinase est connue et décrite chez différents microorganismes. Par exemple dans l'article Albaser et al, 2016 l'activité myrosinase de la bactérie du genre *Citrobacter* a été démontrée via la purification et au séquençage de la protéine qu'ils avaient isolé de la souche.

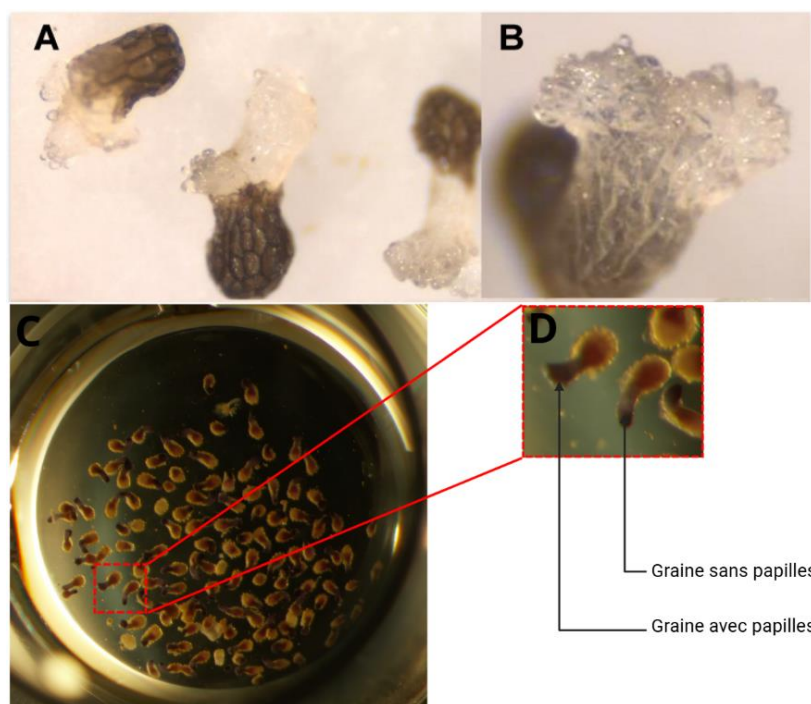


Figure 12 :

A et B : Photos d'haustorium issues de l'article de Fernández-Aparicio et al, 2021

C et D : Photo prise à la loupe binoculaire (x20) avec mise en évidence de papilles chez certaines graines suite à un traitement avec la souche bactérienne UCMB 5133 (Leuginer Nantes 2025)

La séquence obtenue a été comparée à celle d'autres enzymes glucosidases confirmant que l'enzyme ressemblait fortement à la famille GH1, famille des myrosinases.

Nous avons dans le cadre de nos essais utilisé une approche différente pour identifier l'hydrolyse du glucosinolate par différents micro-organismes. En nous appuyant sur l'article de Tomas et al, 2024, nous avons pu obtenir un aperçu rapide de la capacité ou non à hydrolyser le glucosinolate. En effet l'utilisation d'un glucosinolate (GSL) combiné à un chromogène (pNP) permet d'avoir une réponse visuelle lors de son hydrolyse puisqu'un précipité blanc se forme, à minima, pouvant virer au jaune vif lorsque le pH est ajusté. L'activité myrosinase d'une souche peut alors être constatée en très peu de temps.

Nous avons également utilisé des tests biologiques plus sensibles pour détecter cette activité. Les tests de germination en plaque permettent d'obtenir en quelques jours des résultats. Les graines de plantes parasites étant très sensibles au SG l'hydrolyse du glucosinolate même en de très faibles concentrations peut être détectée. En effet dans l'article de Martinez et al, 2024 la concentration minimale pour induire la germination de 50% des graines de *P. ramosa* est de $2,25 \times 10^{-11} \text{M}$. Mais cette sensibilité est extrêmement variable d'une molécule à une autre et d'un parasite à un autre. L'article Oancea et al, 2017 présente d'autres strigolactones de synthèse. L'un d'entre eux provoquerait 50% de germination chez *S. hermonthica* à une concentration de 10^{-5}M contre $9 \times 10^{-7} \text{M}$ chez *P. ramosa* pour la même molécule.

II- CULTURE D'ECOTYPES D'ARABIDOPSIS THALIANA DANS UN SYSTEME MINIATURISE AVEC RECIRCULATION CONTINUE DU MILIEU (EXUFLOW)

1-Inoculation de macérats de sol

L'inoculation de macérats de sol ainsi que de bactéries a eu un impact sur les exsudats racinaires. En effet les exsudats de certaines conditions ont provoqué la germination de *P. ramosa*. Certains résultats posent néanmoins question. Les exsudats issus de la condition "Sol + plante" n'ont déclenché aucune germination contrairement aux conditions avec l'inoculation de macérat de ce même sol en présence d'une plante alors que de précédents travaux au sein du laboratoire montraient un impact du sol naturel sur les exsudats. Il y a plusieurs hypothèses à cela. Tout d'abord il est important de préciser qu'un seul réplicat biologique a pu être analysé. Cela est dû aux *A. thaliana* qui ont moins bien survécu pour cette condition. Ensuite il semble que le temps de culture soit trop court et devrait être prolongé pour obtenir des signaux plus importants. Nous pouvons également supposer que bien qu'il s'agisse du même sol il est possible que sous forme de macérat les communautés microbiennes s'installent plus facilement dans un sol inerte. Il est également possible que la structure du sol de St Ouenne, plus compact du fait de son tamisage, ait impacté l'installation des racines d'*A. thaliana*. La réalisation de cultures avec des conditions supplémentaires : avec ou sans tamisage, serait donc envisageable. Il est également possible que le problème soit d'ordre physiologique. Les plantes n'ont peut-être pas atteint l'état physiologique requis pour produire des exsudats.

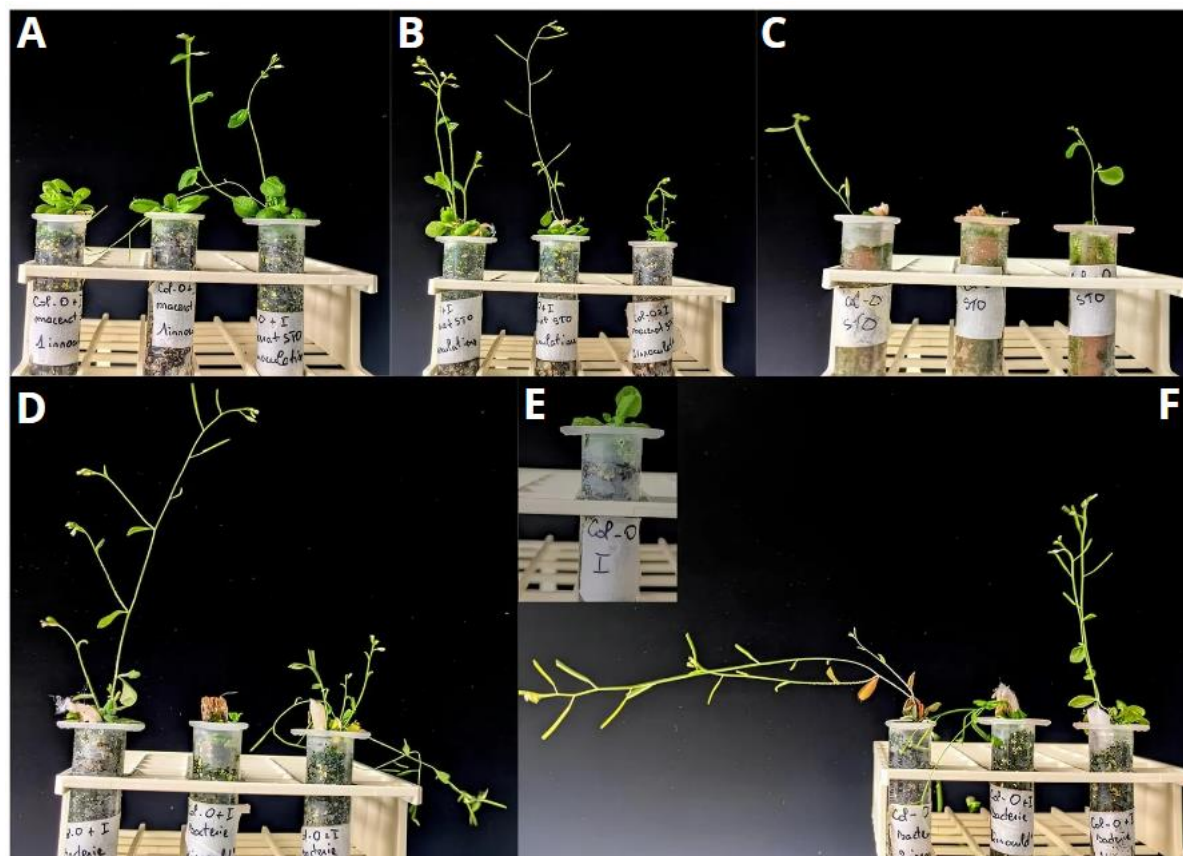


Figure 13 : Photo des différentes *A. thaliana* au bout des 4 semaines de culture avec le système ExuFlow.

A : Plantes avec 1 inoculation de macérats de sol sur substrat inerte

B : Plantes avec 2 inoculations de macérats de sol sur substrat inerte

C : Plante sur sol

D : Plantes avec 1 inoculation de bactéries (WYE1) sur substrat inerte

E : Plante sur substrat inerte

F : Plantes avec 2 inoculations de bactéries (WEY1) sur substrat inerte
(Leuginer Nantes 2025)

2-Inoculations d'une bactérie

Concernant les inoculations de la bactérie WYE1, nous pouvons supposer une différence entre la condition avec 1 seule inoculation, lors de la première semaine, et celle avec 2 inoculations, lors des deux premières semaines. En effet sur le graphique 5, la condition avec 2 inoculations semble provoquer un taux de germination moyen plus important que la condition avec une seule inoculation. Des analyses de métabarcoding et métabolomiques seraient nécessaires pour s'assurer de la présence de la bactérie et donc de son rôle dans la modification des exsudats. Toutefois, les inoculations de WYE1 sur matrice inerte montrent une augmentation du pouvoir de stimulation de la germination des exsudats d'*A. thaliana*. Une augmentation par la bactérie du signal de germination peut donc être suggérée. De même que l'activité myrosinase de cette bactérie peut être supposée au vu des résultats de germination, du criblage réalisé et de l'étude réalisée sur WYE1 dans l'article d'Albaser et al, 2016. Et enfin ces résultats nous confortent dans l'idée que le système de culture miniaturisé, bien qu'améliorable, est fonctionnel.

3-Impact sur la morphologie des plantes

Il a été intéressant d'observer les différences de morphologies des différentes *A. thaliana* en fonction des conditions, voir Figure 13. Peu de différences sont observables entre les conditions avec une inoculation unique ou bien répétée. Toutefois une nette différence de croissance est notable entre les conditions ayant reçues des inoculations (A, B, D, F), quel que soit leur type, par rapport à la condition sans inoculation (E). Les plantes avec inoculation sont bien plus avancées dans leur croissance, la plupart ont entamé leur floraison et les rosettes sont bien plus développées. Alors que sans inoculation la rosette est réduite et aucune inflorescence n'est en formation. Une morphologie similaire est observée avec la condition "Sol". Plusieurs hypothèses sont envisageables. Tout d'abord il est possible que les plantes aient une croissance favorisée lorsque des micro-organismes sont présents.

Par exemple, Qu et al. (2020) montrent que les micro-organismes favorisant la croissance des plantes pouvaient notamment favoriser l'absorption de nutriments minéraux ou bien d'aider à la résistance aux stress abiotiques. Ensuite concernant l'aspect des plantes avec le sol St Ouenne il est possible que le sol ait été compacté au fur et à mesure des arrosages. Dans l'article de Dick et al, 1988, à la suite d'échantillonnages de sols il est démontré que la compaction diminuait significativement la biomasse microbienne et provoquait une réduction de l'activité enzymatique. Dans l'étude de Fu et al, 2025 il est dit que le compactage du sol pouvait interférer avec le développement racinaire et notamment la morphologie des poils racinaires. Le compactage provoquerait un effet négatif sur la longueur, densité et l'ancrage des poils racinaires perturbant la pénétration dans le sol.

Nous pourrions envisager une analyse quantitative de l'impact des micro-organismes sur la croissance des plantes, mais également quantitative. Dans l'article de ([Khasanova](#) et al, 2023) une analyse de la biomasse racinaire et des organes végétatifs a été réalisée ainsi que des mesures de surfaces foliaires en fonction du microbiome du sol.

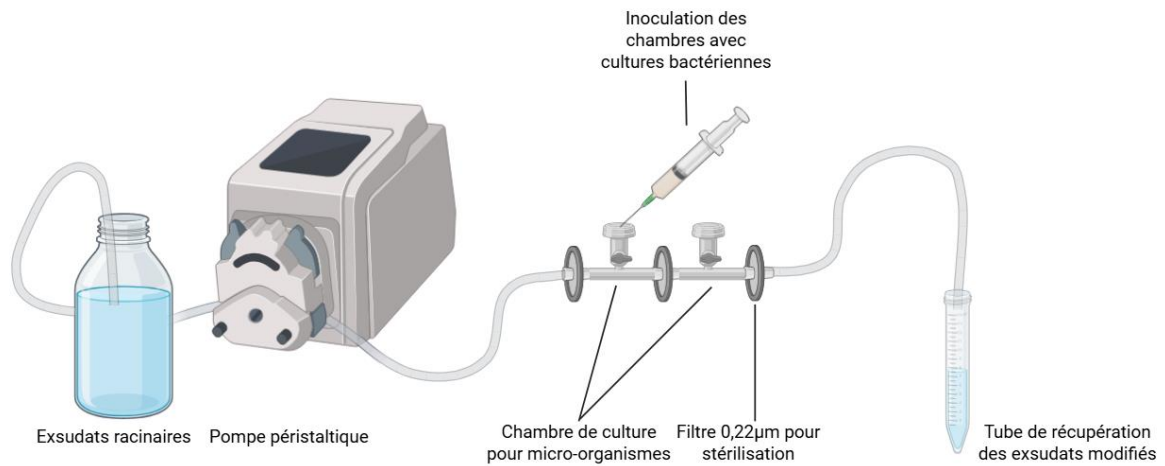


Figure 14 : Représentation d'un système de modification des exsudats par des communautés microbiennes inspirée de l'article de Chesneau et al, 2025 (Leuginer Nantes 2025)

4-Caractère innovant des approches expérimentales

La mise en place d'un système miniaturisé de culture avec recirculation continue du milieu est une approche novatrice pour la récupération d'exsudats racinaires. Cette méthode a permis de juger l'impact du microbiote sur une plante unique dans des conditions très contrôlées. La miniaturisation a rendu possible la multiplication des répliques biologiques tandis que la recirculation continue du milieu assure un arrosage identique entre les conditions tout en favorisant une bonne installation des syncom.

Il existe d'autres méthodes de récupération de ces exsudats racinaires. Diverses méthodes de récupération d'exsudats racinaires ont été appliquées à d'autres systèmes de culture. Certaines études détaillent des installations hydroponiques dans lesquelles les semis une fois germés sont cultivés directement dans un milieu liquide Murashige et Skoog (MS) qui est échantillonné régulièrement pour obtenir les exsudats (Subrahmaniam et al, 2023). D'autres approches, mixtes, proposent une culture en terre dans un premier temps. Puis au moment de la récupération des exsudats les racines sont récupérées, lavées et placées dans une solution d'échantillonnage, afin d'obtenir tous les exsudats racinaires, pendant 2h (Rosenkranz et al. 2020). Outre le stress et les risques d'altération des exsudats, provoqués par ce type d'approches, ces dernières ne sont pas compatibles avec l'étude du microbiote. La plupart des articles présentant ces méthodes cherchent, contrairement à nous, à protéger les exsudats de toutes altérations.

L'article de Chesneau et al, 2025 présente une méthode qui pourrait être exploitable un jour dans l'étude de l'impact du microbiote sur les exsudats racinaires (Figure 14). De façon similaire à notre système, une pompe péristaltique permettrait la circulation des exsudats. Toutefois cette fois au lieu d'inoculer directement le sol de cultures des plantes, les exsudats seraient modifiés lors de leur passage dans différentes chambres de cultures de micro-organismes. Il s'agirait d'une approche différente, ne prenant plus en compte les interactions potentielles entre les micro-organismes ou bien directement entre la plante et son microbiote rhizosphérique. Toutefois cette approche permettrait possiblement d'identifier rapidement l'impact de communautés bactériennes ou fongiques sur les exsudats. Il serait ainsi envisageable d'identifier davantage de micro-organismes à activité myrosinase ou bien d'autres catégories de SG.

CONCLUSION

Durant ce stage, plusieurs résultats significatifs ont été obtenus. Un début de criblage a pu être réalisé, laissant imaginer des perspectives prometteuses pour de futurs essais de SynCom dans le système ExuFlow. Des méthodes innovantes ont également été expérimentées pour détecter l'activité myrosinase chez certains micro-organismes. En plus de ce criblage, qui nous offre désormais une meilleure compréhension de certaines de nos souches bactériennes, les tests d'inoculation de SynCom avec le système ExuFlow se sont révélés fructueux. En effet, ces inoculations constituaient un test, mais il s'est avéré que les exsudats d'*A. thaliana* ont bel et bien été modifiés par la présence des micro-organismes. Ces résultats suggèrent plusieurs conclusions importantes : L'exudome d'*A. Thaliana*, modifié par des micro-organismes, induit la germination chez *P. ramosa*.

Il est possible d'imaginer, sur le long terme, l'identification de micro-organismes capables d'induire ou bien d'inhiber la germination de *P. ramosa* ce qui représenterait un enjeu agronomique majeur.

Des études complémentaires sont toutefois nécessaires pour approfondir ces premiers résultats. Ces résultats ne constituent qu'une première approche. L'étude doit être répliquée et réalisée avec une pompe fonctionnelle pour s'assurer de la reproductibilité. L'expérience pourrait également être complétée avec des analyses supplémentaires de métabarcoding et métabolomique pour identifier les microbes et métabolites présents. Il serait intéressant de déterminer quels stimulants de germination sont présents dans les exsudats et ont déclenché la germination de *P. ramosa*. Deuxièmement, il serait utile d'élargir les essais à des communautés microbiennes plus complexes. Par exemple, en utilisant des SynCom, il serait envisageable de répéter l'expérience avec diverses associations, en fonction des résultats des criblages bactériens, de manière plus sensible et précise. L'ajout de souches fongiques permettrait également de se rapprocher de conditions plus représentatives du milieu naturel.

BIBLIOGRAPHIE

Albaser, A., Kazana, E., Bennett, M.H., Cebeci, F., Luang-In, V., Spanu, P.D., Rossiter, J.T., 2016. Discovery of a Bacterial Glycoside Hydrolase Family 3 (GH3) β -Glucosidase with Myrosinase Activity from a *Citrobacter* Strain Isolated from Soil. *J Agric Food Chem* 64, 1520–1527. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.5b05381>

Asari, S., Tarkowská, D., Rolčík, J., Novák, O., Palmero, D.V., Bejai, S., Meijer, J., 2017. Analysis of plant growth-promoting properties of *Bacillus amyloliquefaciens* UCMB5113 using *Arabidopsis thaliana* as host plant. *Planta* 245, 15–30. <https://doi.org/10.1007/s00425-016-2580-9>

Auger, B., Pouvreau, J.-B., Pouponneau, K., Yoneyama, Kaori, Montiel, G., Le Bizec, B., Yoneyama, Koichi, Delavault, P., Delourme, R., Simier, P., 2012. Germination stimulants of *Phelipanche ramosa* in the rhizosphere of *Brassica napus* are derived from the glucosinolate pathway. *Mol Plant Microbe Interact* 25, 993–1004. <https://doi.org/10.1094/MPMI-01-12-0006-R>

Brito, S.O., Rohan, W.P., Buffum-Robbins, I., Reyes Osorio, P.R., Tribble, A., Segarra, V.A., 2024. Applying Beer's Law in the undergraduate cell biology laboratory: examining the mathematical relationship between optical density, cell concentration, and cell size using budding yeast. *J Microbiol Biol Educ* 25, e00136-24. <https://doi.org/10.1128/jmbe.00136-24>

Brun, G., Braem, L., Thoiron, S., Gevaert, K., Goormachtig, S., Delavault, P., 2018. Seed germination in parasitic plants: what insights can we expect from strigolactone research? *Journal of Experimental Botany* 69, 2265–2280. <https://doi.org/10.1093/jxb/erx472>

Brun, G., Spallek, T., Simier, P., Delavault, P., 2021. Molecular actors of seed germination and haustoriogenesis in parasitic weeds. *Plant Physiology* 185, 1270–1281. <https://doi.org/10.1093/plphys/kiaa041>

Chen, L., Liu, Y., 2024. The Function of Root Exudates in the Root Colonization by Beneficial Soil Rhizobacteria. *Biology (Basel)* 13, 95. <https://doi.org/10.3390/biology13020095>

Chesneau, G., Herpell, J., Wolf, S.M., Perin, S., Hacquard, S., 2025. MetaFlowTrain: a highly parallelized and modular fluidic system for studying exometabolite-mediated inter-organismal interactions. *Nat Commun* 16, 3310. <https://doi.org/10.1038/s41467-025-58530-x>

Chroston, E.C.M., Bziuk, N., Stauber, E.J., Ravindran, B.M., Hielscher, A., Smalla, K., Wittstock, U., 2024. Plant glucosinolate biosynthesis and breakdown pathways shape the rhizosphere bacterial/archaeal community. *Plant, Cell & Environment* 47, 2127–2145. <https://doi.org/10.1111/pce.14870>

Delavault, P., Montiel, G., Brun, G., Pouvreau, J.-B., Thoiron, S., Simier, P., 2017. Chapter Three - Communication Between Host Plants and Parasitic Plants, in: Becard, G. (Ed.), *Advances in Botanical Research, How Plants Communicate with Their Biotic Environment*. Academic Press, pp. 55–82.
<https://doi.org/10.1016/bs.abr.2016.10.006>

Di Salvo, L.P., García, J.E., Puente, M.L., Amigo, J., Anríquez, A., Barlocco, C., Benintende, S., Bochatay, T., Bortolato, M., Cassán, F., Castaño, C., Catafesta, M., Coniglio, A., Díaz, M., Galián, L.R., Gallace, E., García, P., García de Salamone, I.E., Landa, M., Liernur, G., Maneiro, M.L., Massa, R., Malinverni, J., Marchessi, N., Monteleone, E., Oviedo, S., Pobliti, L., Portela, G., Radovancich, D., Righes, S., Rocha, R., Rodríguez Cáceres, E., Rossi, A., Santella, G., Tortora, M.L., Trejo, N., Valenzuela, J.A., Vallejo, D., 2022. The drop plate method as an alternative for *Azospirillum* spp. viable cell enumeration within the consensus protocol of the REDCAI network. *Revista Argentina de Microbiología* 54, 152–157.
<https://doi.org/10.1016/j.ram.2021.05.002>

Dick, R.P., Myrold, D.D., Kerle, E.A., 1988. Microbial Biomass and Soil Enzyme Activities in Compacted and Rehabilitated Skid Trail Soils. *Soil Science Society of America Journal* 52, 512–516.
<https://doi.org/10.2136/sssaj1988.03615995005200020038x>

Fernández-Aparicio, M., Flores, F., Rubiales, D., 2009. Recognition of root exudates by seeds of broomrape (*Orobanche* and *Phelipanche*) species. *Ann Bot* 103, 423–431. <https://doi.org/10.1093/aob/mcn236>

Fernández-Aparicio, M., Masi, M., Cimmino, A., Evidente, A., 2021a. Effects of Benzoquinones on Radicles of *Orobanche* and *Phelipanche* Species. *Plants (Basel)* 10, 746. <https://doi.org/10.3390/plants10040746>

Fernández-Aparicio, M., Masi, M., Cimmino, A., Vilariño, S., Evidente, A., 2021b. Allelopathic Effect of Quercetin, a Flavonoid from *Fagopyrum esculentum* Roots in the Radicle Growth of *Phelipanche ramosa*: Quercetin Natural and Semisynthetic Analogues Were Used for a Structure-Activity Relationship Investigation. *Plants (Basel)* 10, 543. <https://doi.org/10.3390/plants10030543>

Fisher, J.P., Phoenix, G.K., Childs, D.Z., Press, M.C., Smith, S.W., Pilkington, M.G., Cameron, D.D., 2013. Parasitic plant litter input: a novel indirect mechanism influencing plant community structure. *New Phytologist* 198, 222–231.
<https://doi.org/10.1111/nph.12144>

Fu, M., Xiong, P., Zhang, Z., Peng, X., 2025. Responses of root hairs to soil compaction: A review. *Plant Science* 355, 112461.
<https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2025.112461>

Gibot-Leclerc, S., Guinchard, L., Edel-Hermann, V., Dessaint, F., Cartry, D., Reibel, C., Gautheron, N., Bernaud, E., Steinberg, C., 2022. Screening for potential mycoherbicides within the endophyte community of *Phelipanche ramosa* parasitizing

tobacco. FEMS Microbiology Ecology 98, fiac024.
<https://doi.org/10.1093/femsec/fiac024>

Gibot-Leclerc, S., Perronne, R., Dessaint, F., Reibel, C., Le corre, V., 2016. Assessment of phylogenetic signal in the germination ability of *Phelipanche ramosa* on Brassicaceae hosts. Weed Research 56, 452–461.
<https://doi.org/10.1111/wre.12222>

Gibot-Leclerc, S., Sallé, G., Reboud, X., Moreau, D., 2012. What are the traits of *Phelipanche ramosa* (L.) Pomel that contribute to the success of its biological cycle on its host *Brassica napus* L.? Flora - Morphology, Distribution, Functional Ecology of Plants 207, 512–521. <https://doi.org/10.1016/j.flora.2012.06.011>

Goyet, V., Billard, E., Pouvreau, J.-B., Lechat, M.-M., Pelletier, S., Bahut, M., Monteau, F., Spichal, L., Delavault, P., Montiel, G., Simier, P., 2017. Haustorium initiation in the obligate parasitic plant *Phelipanche ramosa* involves a host-exuded cytokinin signal. J. Exp. Bot. 68, 5539–5552. <https://doi.org/10.1093/jxb/erx359>

Großkinsky, D.K., Tafner, R., Moreno, M.V., Stenglein, S.A., García de Salamone, I.E., Nelson, L.M., Novák, O., Strnad, M., van der Graaff, E., Roitsch, T., 2016. Cytokinin production by *Pseudomonas fluorescens* G20-18 determines biocontrol activity against *Pseudomonas syringae* in *Arabidopsis*. Sci Rep 6, 23310. <https://doi.org/10.1038/srep23310>

Kawa, D., Thiombiano, B., Shimels, M.Z., Taylor, T., Walmsley, A., Vahldick, H.E., Rybka, D., Leite, M.F.A., Musa, Z., Bucksch, A., Dini-Andreote, F., Schilder, M., Chen, A.J., Daksa, J., Etalo, D.W., Tessema, T., Kuramae, E.E., Raaijmakers, J.M., Bouwmeester, H., Brady, S.M., 2024. The soil microbiome modulates the sorghum root metabolome and cellular traits with a concomitant reduction of *Striga* infection. Cell Reports 43, 113971. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2024.113971>

Khasanova, A., Edwards, J., Bonnette, J., Singer, E., Haque, T., Juenger, T.E., 2023. Quantitative genetic-by-soil microbiome interactions in a perennial grass affect functional traits. Proc Biol Sci 290, 20221350. <https://doi.org/10.1098/rspb.2022.1350>

Kokla, A., Melnyk, C.W., 2018. Developing a thief: Haustoria formation in parasitic plants. Developmental Biology 442, 53–59. <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2018.06.013>

Kruh, L.I., Lahav, T., Abu-Nassar, J., Achdari, G., Salami, R., Freilich, S., Aly, R., 2017. Host-parasite-bacteria triangle: The microbiome of the parasitic weed *Phelipanche aegyptiaca* and tomato-*solanum lycopersicum* (Mill.) as a host. Frontiers in Plant Science 8, undefined-undefined. <https://doi.org/10.3389/fpls.2017.00269>

Martinez, L., Pouvreau, J.-B., Jestin, C., Montiel, G., Gravot, A., Berardocco, S., Marnet, N., Bouchereau, A., Delage, E., Simier, P., Poulin, L., 2024. Comparative Analysis of Two Neighboring Conducive and Suppressive Soils Toward Plant

Parasitism Caused by *Phelipanche ramosa* on *Brassica napus*. *Phytobiomes Journal* 8, 425–445. <https://doi.org/10.1094/PBIOMES-12-23-0140-R>

Martinez, L., Pouvreau, J.-B., Montiel, G., Jestin, C., Delavault, P., Simier, P., Poulin, L., 2023. Soil microbiota promotes early developmental stages of *Phelipanche ramosa* L. Pomel during plant parasitism on *Brassica napus* L. *Plant Soil* 483, 667–691. <https://doi.org/10.1007/s11104-022-05822-6>

Oancea, F., Georgescu, E., Matusova, R., Georgescu, F., Nicolescu, A., Raut, I., Jecu, M.-L., Vladulescu, M.-C., Vladulescu, L., Deleanu, C., 2017. New Strigolactone Mimics as Exogenous Signals for Rhizosphere Organisms. *Molecules* 22, 961. <https://doi.org/10.3390/molecules22060961>

Pouvreau, J.-B., Gaudin, Z., Auger, B., Lechat, M.-M., Gauthier, M., Delavault, P., Simier, P., 2013. A high-throughput seed germination assay for root parasitic plants. *Plant Methods* 9, 32. <https://doi.org/10.1186/1746-4811-9-32>

Press, M.C., Phoenix, G.K., 2005. Impacts of parasitic plants on natural communities. *New Phytologist* 166, 737–751. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2005.01358.x>

Qu, Q., Zhang, Z., Peijnenburg, W.J.G.M., Liu, W., Lu, T., Hu, B., Chen, Jianmeng, Chen, Jun, Lin, Z., Qian, H., 2020. Rhizosphere Microbiome Assembly and Its Impact on Plant Growth. *J. Agric. Food Chem.* 68, 5024–5038. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.0c00073>

Rosenkranz, T., Oburger, E., Baune, M., Weber, G., Puschenreiter, M., 2021. Root exudation of coumarins from soil-grown *Arabidopsis thaliana* in response to iron deficiency. *Rhizosphere* 17, 100296. <https://doi.org/10.1016/j.rhisph.2020.100296>

Stojanova, B., Delourme, R., Duffé, P., Delavault, P., Simier, P., 2019. Genetic differentiation and host preference reveal non-exclusive host races in the generalist parasitic weed *Phelipanche ramosa*. *Weed Research* 59, 107–118. <https://doi.org/10.1111/wre.12353>

Subrahmaniam, H.J., Lind Salomonsen, C., Radutoiu, S., Ehlers, B.K., Glasius, M., 2023. Unraveling the secrets of plant roots: Simplified method for large scale root exudate sampling and analysis in *Arabidopsis thaliana*. *Open Res Eur* 3, 12. <https://doi.org/10.12688/openreseurope.15377.3>

Tomas, J., Lafite, P., Schuler, M., Tatibouët, A., 2024. Enzyme-Triggered Chromogenic and Fluorogenic Probes for Myrosinase Activity Detection. *J Agric Food Chem* 72, 23224–23232. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.4c03326>

Tsuzuki, K., Suzuki, T., Kuruma, M., Nishiyama, K., Hayashi, K., Hagihara, S., Seto, Y., 2024. Radicle Growth Regulation of Root Parasitic Plants by Auxin-related Compounds. *Plant and Cell Physiology* 65, 1377–1387. <https://doi.org/10.1093/pcp/pcae071>

Veronesi, C., Billard, E., Delavault, P., Simier, P., 2025. (±)-Catechins inhibit prehaustorium formation in the parasitic weed *Phelipanche ramosa* and reduce tomato infestation. *Pest Manag Sci* 81, 720–726. <https://doi.org/10.1002/ps.8472>

Vives-Peris, V., de Ollas, C., Gómez-Cadenas, A., Pérez-Clemente, R.M., 2020. Root exudates: from plant to rhizosphere and beyond. *Plant Cell Rep* 39, 3–17. <https://doi.org/10.1007/s00299-019-02447-5>

Xi, J., Lei, B., Liu, Y., Ding, Z., Liu, J., Xu, T., Hou, L., Han, S., Qian, X., Ma, Y., Xue, Q., Gao, J., Gu, J., Tiedje, J.M., Lin, Y., 2022. Microbial community roles and chemical mechanisms in the parasitic development of *Orobancha cumana*. *Imeta* 1, e31. <https://doi.org/10.1002/imt2.31>

Yoneyama, Kaori, Xie, X., Kusumoto, D., Sekimoto, H., Sugimoto, Y., Takeuchi, Y., Yoneyama, Koichi, 2007. Nitrogen deficiency as well as phosphorus deficiency in sorghum promotes the production and exudation of 5-deoxystrigol, the host recognition signal for arbuscular mycorrhizal fungi and root parasites. *Planta* 227, 125–132. <https://doi.org/10.1007/s00425-007-0600-5>

Yoshida, S., Cui, S., Ichihashi, Y., Shirasu, K., 2016. The Haustorium, a Specialized Invasive Organ in Parasitic Plants. *Annual Review of Plant Biology* 67, 643–667. <https://doi.org/10.1146/annurev-arplant-043015-111702>

TABLE DES ILLUSTRATIONS

Figure 1 : Organes aériens de <i>Phelipanche ramosa</i>	2
Figure 2 : Cycle de vie de <i>P. ramosa</i> d'après Delavault et al. 2017	2
Figure 3 : : Protocol de stérilisation des graines de <i>P. ramosa</i> d'après Pouvreau et al, 2013 (Leuginer Nantes 2025)	6
Figure 4 : Méthode de dénombrement des colonies bactériennes (Leuginer Nantes 2025).....	8
Figure 5 : Exemple de plan de plaque 96 puits pour un test (Leuginer Nantes 2025)	9
Figure 6 : Photos prises à la loupe binoculaire (x20 et x25) ; A : Graines germées ; B : Graines non germées (Leuginer Nantes 2025).....	9
Figure 7 : Schéma du système ExuFlow (Leuginer Nantes 2025)	10
Figure 8 : Photo du système installé (Par Ahmed Choukri)	10
Figure 9 : Récapitulatif des conditions testées avec le système ExuFlow (Leuginer Nantes 2025)	10
Figure 10 : Planning de culture du système ExuFlow (Leuginer Nantes 2025) ..	11
Figure 11 : Schéma du mécanisme de récupération des exsudats sans pompe péristaltique (Leuginer Nantes 2025)	11
Figure 12 :.....	15
Figure 13 : Photo des différentes <i>A. thaliana</i> au bout des 4 semaines de culture avec le système ExuFlow.	17
Figure 14 : Représentation d'un système de modification des exsudats par des communautés microbiennes inspirée de l'article de Chesneau et al, 2025 (Leuginer Nantes 2025)	18

TABLE DES TABLEAUX

Tableau 1 : Description des souches bactériennes utilisées pour le criblage.....	7
Tableau 2 : Résultats du dénombrement des colonies présentes par souches bactériennes après calibrage à une DO_{600} de 0,1	12

TABLE DES GRAPHIQUES

<i>Graphique 1 : Barplot de l'activité myrosinase d'après les mesures d'absorbance (A_{405}) en fonction de la souche bactérienne. Analyse statistique avec un test de Welch par rapport au témoin négatif ($p < 0,05$ (*); $p < 0,01$ (**); indiquent une différence significative)</i>	12
Graphique 2 : Taux de germination moyen de graines de <i>P. Ramosa</i> en fonction des différentes souches bactériennes ($DO_{600} = 0,1$) obtenu après dénombrement des graines germées. Analyse statistique par ANOVA suivie d'un test de Dunett par rapport au témoin positif ($p < 0,001$; *** indique une différence significative)... 13	13
Graphique 3 : Taux d'inhibition moyen de graines de <i>P. Ramosa</i> en fonction des différentes souches bactériennes ($DO_{600} = 0,1$) obtenu après dénombrement des graines inhibées. Analyse statistique par ANOVA suivie d'un test de Dunett par rapport au témoin positif ($p < 0,001$; *** indique une différence significative)... 13	13
Graphique 4 : Boxplot du taux de germination de <i>P. Ramosa</i> en W3 avec inoculation de macérats de sol. Données obtenues par extrapolation de la mesure d'absorbance ($A_{570-630}$). Une analyse statistique a été réalisée à l'aide d'un test GLM ($p < 0,05$)	14
Graphique 5 : Boxplot du taux de germination de <i>P. Ramosa</i> en W3 avec inoculation de la souche bactérienne WYE1. Données obtenues par extrapolation de la mesure d'absorbance ($A_{570-630}$). Une analyse statistique a été réalisée à l'aide d'un test GLM ($p < 0,05$)	14

RESUME

Effet des communautés microbiennes sur l'activité de l'exudome d'*Arabidopsis thaliana* vis-à-vis de la plante parasite *Phelipanche ramosa*.

Phelipanche ramosa est une plante parasite de la famille des *Orobanchaceae*. Elle est responsable de nombreuses pertes de rendement, notamment dans l'ouest de la France, chez les plantes hôtes qu'elle parasite. L'étude des interactions entre *P. ramosa* et ses différents hôtes était jusqu'à présent centrée sur leur dialogue direct via des stimulants de germination. Or un troisième intervenant, le microbiote de la rhizosphère, serait un intermédiaire supplémentaire dans l'interaction. Il permettrait la modification des exsudats racinaires de l'hôte rendant ainsi possible la germination de la graine parasite. Dans le cadre de notre étude plusieurs souches bactériennes ont été criblées afin d'identifier leur potentiel impact sur des exsudats racinaires. En parallèle afin d'observer directement l'impact du microbiote sur des exsudats racinaires un système de culture miniaturisé avec recirculation continue du milieu (ExuFlow) a été mis en place. Ce système permet la culture d'*A. thaliana* avec des microbiotes rhizosphériques différents. Pour cela des communautés microbiennes synthétiques ont été créées ainsi que des macérats de sol. Nous avons pu observer un impact significatif de l'inoculation de micro-organismes sur le taux de germination des graines parasites mises en contact avec les exsudats racinaires récupérés. Cette étude permet l'amélioration de notre compréhension des interactions entre le parasite, son hôte et le microbiote rhizosphérique tout en laissant imaginer des perspectives de contrôle pour le futur.

Mots-clefs : *P. ramosa*, microbiote, stimulants de germination, interaction

ABSTRACT

Impact of microbial communities on the root exudome activity of *Arabidopsis thaliana* in response to the parasitic plant *Phelipanche ramosa*.

Phelipanche ramosa is a parasitic plant belonging to the *Orobanchaceae* family. It is responsible for significant yield losses, particularly in western France, in the host plants it parasitizes. The study of interactions between *P. ramosa* and its various hosts had until now focused on their direct dialogue via germination stimulants. However, a third actor, the rhizosphere microbiota, may act as an additional intermediary in the interaction. It could enable the modification of the host's root exudates, thus allowing the germination of the parasitic seed. In the context of our study, several bacterial strains were screened to identify their potential impact on root exudates. In parallel, to directly observe the impact of the microbiota on root exudates, a miniaturized culture system with continuous medium recirculation (ExuFlow) was set up. This system allowed the cultivation of *A. thaliana* with different rhizosphere microbiota. For this purpose, synthetic microbial communities were created, as well as soil macerates. We were able to observe a significant impact of microorganism's inoculation on the germination rate of parasitic seeds exposed to the collected root exudates. This study enhances our understanding of the interactions between the parasite, its host, and the rhizosphere microbiota, while opening up potential avenues for future control strategies.

Key words: *P. ramosa*, microbiota, germination stimulants, interaction