
A déposer par les porteurs du projet de thèse sur le site web du Collège Doctoral à l'adresse suivante : <http://college-doctoral.univ-amu.fr/> onglet APPEL A PROJETS, sous rubrique AAP Inter-ED, au plus tard le vendredi le 6/03/2020 à 12h. Les responsables d'équipes et directeurs d'unités de recherche partenaires doivent obligatoirement être informés avant le dépôt du projet de thèse.

Intitulé du Projet : Stratégies de défense physico-chimiques des forêts méditerranéennes face aux restrictions de précipitations en milieu naturel

Nom et Prénom du Directeur de thèse principal : Béatrice TUCCIO-LAURICELLA
Adresse email : beatrice.tuccio-lauricella@univ-amu.fr
Date : 3 mars 2020

Unité de recherche de rattachement : Institut de Chimie Radicalaire
Nom et Prénom du Directeur de l'unité de Recherche : Didier Gignes

Ecole doctorale principale : ED 250

Nom et Prénom du co-Directeur de thèse : Elena ORMENO LAFUENTE
Adresse email : elena.ormeno-lafuente@imbe.fr

Unité de recherche de rattachement : Institut Méditerranéen d'Ecologie et Biodiversité marine et continentale (IMBE)
Nom et Prénom du Directeur de l'unité de Recherche : Catherine Fernandez

Ecole doctorale partenaire : ED251

Nouvelle collaboration (mettre une croix)

Collaboration existante (mettre une croix)

Avez-vous déposé le même projet dans le cadre d'un autre appel à projets ? Oui , Non
Si oui, lequel ? :

Descriptif du projet (ne pas dépasser deux pages bibliographie comprise) :

Anticiper la capacité d'adaptation des écosystèmes forestiers aux changements globaux est un enjeu majeur, particulièrement dans les forêts méditerranéennes car elles sont soumises à des sécheresses estivales de plus en plus récurrentes et longues et à des événements pluviométriques de forte intensité. De plus, les prévisions climatiques laissent entrevoir une réduction des pluies estivales d'entre 20 et 40% pour la fin du XXI siècle et la succession de plusieurs années sèches de manière fréquente (Giorgi and Lionello, 2008 ; Sheffield and Wood, 2008).

La plasticité, la résilience et les compensations (ou trade-offs) entre les défenses physico-chimiques permettent au végétal de s'adapter au déficit hydrique. **Les défenses physiques**, comme celles relevant de la morphologie du feuillage, participent à l'adaptation du végétal au déficit hydrique. Elles sont variées et consistent par exemple à *i*) augmenter l'épaisseur des feuilles (dans leur globalité ou de certains tissus comme le parenchyme spongieux) (Ennajeh et al., 2010), *ii*) développer un trichome dense sur la surface foliaire afin d'augmenter la réflectance de la radiation solaire et donc de réduire la température foliaire et la perte d'eau (Redha et al., 2011), et *iii*) positionner les cires cuticulaires sous forme de cristaux qui encryptent (ou occultent) les stomates limitant donc la perte d'eau (Roth-Nebelsick et al., 2013).

Les défenses chimiques, en particulier celles relevant du métabolome, se mesurent à travers l'accumulation de métabolites universels (car présents dans toutes les espèces végétales) comme les tocophérols et les caroténoïdes reconnus pour leurs propriétés antioxydantes. De même, les métabolites non universels (également nommés métabolites secondaires ou spécialisés) comme les polyphénols ou les Composés Organiques Volatils Biogéniques permettent au végétal de lutter contre le stress oxydatif associé au manque de précipitations car ils diminuent la concentration cellulaire en espèces oxydantes comme les radicaux OH ou l'oxygène singulet (Close and McArthur 2002; Vickers et al 2009). De plus, les cires de la cuticule foliaire jouent également un rôle important dans la protection contre le manque d'eau car elles limitent l'évapotranspiration (Yadav et al., 2004). Si tous les végétaux produisent des polyphénols, des COVB et des cires, les composés varient avec l'espèce.

Les études précédentes de l'IMBE chez *Quercus pubescens* Wild. (chêne pubescent) (Saunier et al., 2018 ; Saunier et al., 2017 ; Saunier et al., accepté avec révisions), montrent que seuls COVB chutent de la 2^{ème} année de déficit hydrique sous climat méditerranéen (mesures effectuées sur le site de l'O₃HP). En revanche, la production des autres métabolites se maintient constante pendant les 3 premières années de déficit hydrique. Il faut attendre la 4^{ème} année de restriction des précipitations pour observer que la concentration en polyphénols diminue lorsque les arbres sont soumis à une sécheresse aggravée (-30%) comparé au stress naturel. Seul un type de polyphénols, à savoir les kaempférols (appartenant aux flavonols) résistent à cette chute voir double en concentration en été sous stress hydrique aggravé (Saunier et al., accepté avec révisions). Cela suggère que les kaempférols jouent un rôle clé dans la protection du végétal face au déficit hydrique comme démontré dans les cellules animales (Kaurinovic and Vastag, 2019).

L'objectif de ce projet de thèse est **d'identifier les mécanismes de défense morpho-métabolomiques du feuillage de *Q. pubescens* pour s'adapter au déficit hydrique récurrent** après 8 ans de restriction des précipitations sous climat méditerranéen, avec un focus sur deux aspects : *i*) les compensations entre ces défenses et *ii*) le lien entre production, localisation dans les tissus et rôle biologique. Pour cela, l'étude sera structurée en 4 tâches (Fig 1) :

Tâche 1- Caractérisation du fonctionnement (piégeage de CO₂) **et de la pression oxydante** *via* le dosage des radicaux OH[•]. Ce dosage sera effectué par spin trapping/RPE (Ruiz et al. 2014, Lauricella and Tuccio, 2020) sous stress hydrique naturel et aggravé récurrent (8 ans de restriction des précipitations) au sein de la forêt de *Q. pubescens* situé sur le site de l'O₃HP (lire description plus bas).

Tâche 2- Caractérisation du métabolome du feuillage sous déficit hydrique aggravé et récurrent. Deux types de métabolites seront étudiés : des métabolites universels (e.g. tocophérols, caroténoïdes) et des métabolites non universels (émissions de COVB, cires et polyphénols avec un focus sur les flavonols). Il s'agira de doser les polyphénols et les cires, de les localiser et d'étudier leur structure dans les tissus foliaires grâce à différentes techniques d'imagerie en collaboration avec l'institut Fresnel.

Tâche 3- Caractérisation de la morphologie du feuillage sous déficit hydrique aggravé et récurrent au sein de cette même forêt. La morphologie de la feuille sera étudiée à différentes échelles : feuille entière, surface et tissus internes (Fig 1).

Tâche 4- Rôle des kaempférols dans la protection de *Q. pubescens* face à la pression oxydative liée au déficit hydrique en milieu semi-contrôlé (phytotron).

A l'exception de la tâche 4 qui sera effectuée en laboratoire, les autres tâches portent donc sur des travaux *in situ* sur le site de l'O₃HP (Oak Observatory at Observatoire de Haute Provence). Ce site, dominé par une forêt de *Q. pubescens*, se situe à St Michel Observatoire, 100 km au Nord de Marseille, dans les Alpes de Haute-Provence. Dans ce site, un système d'exclusion des pluies (toiture mobile) a été installé en mai 2012 afin de restreindre les précipitations (~ -30%) sur une surface de 300 m² de forêt dominée par *Q. pubescens*. Une parcelle adjacente reçoit les pluies annuelles naturelles (parcelle sous stress hydrique naturel).

Q. pubescens, modèle végétal décidu, a été choisi pour cette étude car il est reconnu pour sa résistance remarquable au déficit hydrique. Par conséquent, si cette espèce végétale rencontre des difficultés pour s'adapter à la restriction de précipitations simulée *in situ*, on peut s'attendre à un risque majeur pour d'autres espèces moins tolérantes à ce type de stress. De plus, *Q. pubescens* est présent en Europe sous climat continental et méditerranéen et est particulièrement abondant dans le sud de la France, où il occupe 418 000 ha dont 321 000 ha en région PACA-Sud.

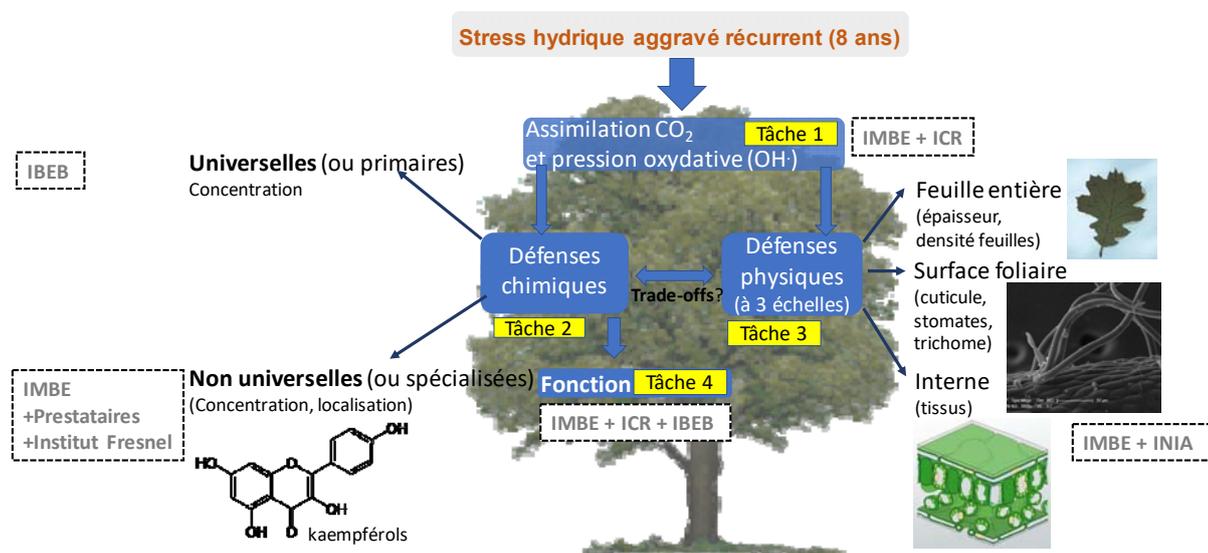


Figure 1 - Structure du projet de thèse. Le nom des différents laboratoires apparaît (rectangles avec contour en pointillé) est développé dans les sections suivantes.

Références bibliographiques

- Close DC. and McArthur, C.: Rethinking the role of many plant phenolics protection from photodamage not herbivores?, *Oikos*, 99, 166–172, 2002.
- Ennajeh M, Vadel AM, Cochard H. and Khemira H: Comparative impacts of water stress on the leaf anatomy of a drought-resistant and a drought-sensitive olive cultivar, *J. Hortic. Sci. Biotechnol.* 85, 289–294, 2010.
- Saunier A, Ormeno et al., Resistance of native oak to recurrent drought conditions simulating predicted climatic changes in the Mediterranean region, *Plant Cell Environ.*, 41, 2299–2312, 2018.
- Ormeno E, Viros J., et al. « Exogenous Isoprene Confers Physiological Benefits in a Negligible Isoprene Emitter (*Acer Monspensulanum* L.) Under Water Deficit ». *Plants* 9, 2020.
- Saunier A, Fernandez C, Greff S, Blande JD, Lecareux C, Ormeño E.: *Quercus pubescens* leaf metabolome is modulated by amplified drought over three seasonal cycles (accepté avec revisions). *Metabolomics*.
- Redha A, Al-Mansour N, Suleman P, Afzal M, Al-Hasan R.: Leaf Traits and Histochemistry of Trichomes of *Conocarpus lancifolius* a Combretaceae in Semi-Arid Conditions, *Am. J. Plant Sci.*, 02, 165–174, 2011.
- Roth-Nebelsick A. et al: Stomatal encryption by epicuticular waxes as a plastic trait modifying gas exchange in a Mediterranean evergreen species (*Quercus coccifera* L.): Stomatal encryption in *Quercus coccifera*, *Plant Cell Environ.* 36, 579–589, 2013.
- Ruiz, J., Azéma, J., Payrastra, C., Baltas, M., Tuccio, B., André-Barrès, C: Antimalarial Bicyclic Peroxides Belonging to the G-Factor Family: Mechanistic Aspects of their Formation and Iron (II) Induced Reduction. *Current Topics Med. Chem.*, 14, 1668-1683, 2014.
- Lauricella, R., Tuccio, B. : Detection and characterisation of free radicals after spin trapping, *in* *Electron Paramagnetic Resonance Spectroscopy vol.2 : applications* (dir. P. Bertrand), Ed. Springer, 51-82, 2020.

Argumentaire. Faire apparaître l'intérêt scientifique et le caractère interdisciplinaire et éventuellement intersectoriel de la recherche qui sera menée dans le cadre du projet de thèse, ainsi que l'intérêt de la collaboration et les retombées attendues, ... :

Le projet de thèse proposé fédère un **consortium de chercheurs** spécialisés en **écologie chimique (IMBE, UMR 7263)**, en **chimie radicalaire (ICR, UMR 7273)**, en **physiologie végétale (BIAM : Institut de Biosciences et Biotechnologie d'Aix Marseille, UMR 7265)** et en **physique optique (Institut Fresnel, UMR 7249)**. L'étudiant collaborera également avec ces 2 derniers laboratoires de recherche. Ces unités de recherche appartiennent à **quatre instituts du CNRS** : l'Institut écologie et environnement (INEE) pour l'IMBE, l'Institut de Chimie (INC) pour l'ICR, l'Institut des Sciences biologiques (INSB) pour le BIAM et l'Institut des sciences de l'ingénierie et des systèmes (INSIS) pour l'Institut Fresnel. La collaboration de différentes unités travaillant dans des champs disciplinaires différents permettra de mener à bien cette étude qui se veut **intégrative** car elle combine 3 dimensions (production, localisation et fonction des métabolites) et 3 échelles (feuilles, tissus et molécules), en rupture donc avec la littérature existante qui considère uniquement un nombre limité de ces points.

Au sein de l'**ICR**, l'étudiant sera formé à la chimie radicalaire et plus particulièrement en spin trapping crucial pour l'étude de la pression oxydative (en particulier les radicaux OH \cdot) dans les tissus du végétal. Cette mesure, qui sera effectuée tout au long du projet, est particulièrement complexe compte tenu de la réactivité de cette espèce radicalaire. Le couplage de ce radical avec les différentes mesures métabolomiques permettra d'évaluer les trade-offs (ou compensations) entre la pression oxydative au sein du végétal et les défenses chimiques et physiques qu'il met en place. Ce point est essentiel pour l'impact de ce travail au sein de la communauté scientifique sur le plan fondamental, voir finalisée si certains métabolites montrent une activité anti-radicalaire marquée.

Au sein de l'**IMBE**, l'étudiant sera encadré sur *i*) les mesures d'échanges gazeux, notamment le piégeage de CO $_2$, qui est une métrique essentielle pour évaluer le fonctionnement du végétal ; *ii*) l'étude des traits morphologiques et *iii*) le dosage des métabolites non universels, à savoir, les cires cuticulaires (au sein du Service Commun de l'IMBE) et du métabolome globale (au sein de la plateforme Malabar) comprenant notamment des polyphénols. Pour l'étude en profondeur des flavonols il est prévu de faire intervenir un prestataire externe (en lien avec nos programmes précédents plateforme de métabolomique de Rennes (UMR IGEPP 1349 Centre, INRA Science impact).

Le **BIAM**, qui collabore avec l'IMBE depuis 2012 *via* plusieurs programmes de recherche comme l'ANR Sec-Prime2, apporte une plus-value importante au projet compte tenu des approches mécanistiques utilisées en physiologie végétale qui permettront d'appréhender le rôle biologique des molécules produites chez le végétal. En particulier, l'étudiant effectuera le dosage des métabolites universels (tocophérols, caroténoïdes) au BIAM. De même, la collaboration avec l'**institut Fresnel** est clé pour la valorisation des travaux car les techniques employées sont innovantes et apportent donc une nouvelle approche d'analyse n'a pas encore été utilisée dans le cadre de l'écologie végétale. L'étudiant utilisera les techniques d'imagerie structurale spécifique chimiquement au sein de l'Institut Fresnel.

La proximité géographique des unités de recherche impliquées et est également un atout majeur pour le déroulement du projet car, par exemple, le partage et donc le transport d'échantillons dans l'azote liquide pourra se faire aisément. Toutes les unités se trouvent sur Marseille à l'exception du BIAM qui se trouve à Cadarache, 70km au nord de Marseille. Si l'IMBE est une unité multi-sites, l'étudiant sera mené à travailler sur les sites de Marseille uniquement.

Source de financement de l'activité recherche dans le cadre de la thèse :

Ce projet de thèse serait financé par le programme METAPHORES déposé par E. Ormeno (IMBE) avec l'ICR et les autres laboratoires cités comme partenaires, dans le cadre de l'AAP 2020 « Adaptation du vivant à son environnement ». Cet AAP a été lancé par le CNRS dans le cadre de la Mission pour les initiatives transversales et interdisciplinaires (MIT).

Le financement aurait lieu pendant 2 ans à hauteur de 30ke/a afin de couvrir les frais de *i) déplacements* sur les différents sites d'étude et pour assister à différents congrès, *ii) fonctionnement* qui comprend notamment l'utilisation du Service Commun d'Ecologie chimique de l'IMBE, la plateforme d'imagerie PRATIM de l'AMU pour les analyses au MEB et les mesures en confocal et *iii) prestations de service* au sein de deux Plateformes (Microscopie optique CIFOR-INIA à Madrid, Espagne) et, plateforme de métabolomique de Rennes (UMR IGEPP 1349 Centre, INRA Science impact).

En accord avec l'étudiant, les directeurs de thèse envisagent le dépôt d'un dossier de candidature dans le cadre Erasmus +, permettant à l'étudiant d'effectuer un séjour de plusieurs mois dans un laboratoire européen. En particulier, il s'agirait d'effectuer un séjour de 3 mois à l'INIA (Madrid) co-encadré par des chercheurs qui collaborent avec l'IMBE depuis 2016. Cette mobilité est en effet un des critères pour obtenir le diplôme de doctorat avec le label européen.