

2022-2023

Mention Biologie Végétale



Caractérisation de la sensibilité de mutants de peptides sécrétés

Phénotypage de la résistance d'*Arabidopsis thaliana*
au champignon nécrotrophe *Alternaria brassicicola*
chez des mutants de peptides de plante identifiés
par transcriptomique

Goupille Valentin |

Sous la direction de M. Grappin Philippe et |
M. Guillemette Thomas

Membres du jury

Simier Philippe | Président du jury

Grappin Philippe | Maître de stage

Véronési Christophe | Tuteur

Limami Anis | Auditeur

Soutenu publiquement
le 07/07/2023



L'auteur du présent document vous autorise à le partager, reproduire, distribuer et communiquer selon les conditions suivantes :



- Vous devez le citer en l'attribuant de la manière indiquée par l'auteur (mais pas d'une manière qui suggérerait qu'il approuve votre utilisation de l'œuvre).
- Vous n'avez pas le droit d'utiliser ce document à des fins commerciales.
- Vous n'avez pas le droit de le modifier, de le transformer ou de l'adapter.

**Consulter la licence creative commons complète en français :
<http://creativecommons.org/licences/by-nc-nd/2.0/fr/>**

Ces conditions d'utilisation (attribution, pas d'utilisation commerciale, pas de modification) sont symbolisées par les icônes positionnées en pied de page.



REMERCIEMENTS

Tout d'abord, je souhaite remercier l'ensemble de l'équipe pédagogique du Master de biologie végétale pour m'avoir permis de découvrir de nouveaux horizons dans le domaine du végétal. Je remercie également plus spécifiquement **Thomas Guillemette** de m'avoir proposé ce stage. Je souhaite aussi remercier l'équipe **FungiSem** au grand complet de l'accueil chaleureux que j'ai reçu.

Je souhaite également **Fabienne et Aurélia** du plateau **IMAC**, ainsi qu'à **Cassandra** pour les conseils sur l'utilisation du microscope.

Merci beaucoup à **Sophie Aligon** pour sa gentillesse, sa compassion et son implication dans la partie essais sur plantes de mon stage, sans qui les manipulations n'auraient pas été possible.

Merci également à **Julie Bourbeillon** de l'équipe **ImHorPhen** pour ses conseils et son temps consacré pour la création des scripts qui m'ont permis de faire l'analyse d'image pour mon expérience sur rosette.

Je remercie profondément **Philippe Grappin** de m'avoir encadré, pour le partage de ses connaissances et pour toute la confiance qu'il m'a accordé tout au long de ce stage qui m'a permis de m'épanouir et de gagner en autonomie. Je le remercie également pour son implication dans la correction de ce présent rapport.

Merci à **Sébastien Aubourg** à l'origine du projet **STRESS-PEPT**, ainsi que l'ensemble des personnes avec qui nous avons pu échanger sur les résultats obtenus.

ENGAGEMENT DE NON PLAGIAT

Je, soussigné(e) Valentin Goupille
déclare être pleinement conscient(e) que le plagiat de documents ou d'une
partie d'un document publiée sur toutes formes de support, y compris l'internet,
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 ou mémoire.

le **06 / 05 / 2023**

Glossaire

Conidies : spores mises en place chez les organismes fongiques et en particulier les ascomycètes, assurant une reproduction asexuée

Gynodioïque : Plante qui possède des pieds femelles et des pieds hermaphrodites. Cas particulier de plante dioïque.

Nécrotrophe : organisme hétérotrophe pratiquant la nécrotrophe, stratégie parasitaire consistant en une invasion rapide des tissus hôtes, qui une fois tués par le parasite constituent sa ressource trophique.

Peptides sécrétés : Également appelés phytohormones peptidiques ou phytocytokines. Ce sont de courts fragments de protéines qui sont synthétisés par les cellules végétales et libérés dans leur environnement, agissant comme des signaux chimiques pour communiquer avec d'autres cellules ou organismes. Ceux-ci jouent un rôle indispensable pour les processus de croissance et de défense des plantes.

Liste des abréviations

A. brassicicola : *Alternaria brassicicola*

A. thaliana : *Arabidopsis thaliana*

aa : acide aminées

ANAN : Analyses des Acides nucléiques

COMIC : Collection de microorganismes

CRP : Cystein Rich Peptides

EEV : Échelle d'Évaluation Visuelle

Écotype Col : Écotype Colombia

Gmax : Germination maximale

IARA : Institut Agro Rennes Angers

IMAC : Plateau Technique « Imagerie Cellulaire »

INRAE : Institut National de Recherche pour l'Agriculture, l'Alimentation et l'environnement

IRHS : Institut de Recherche en Horticulture et Semences

IRHS : Institut de recherche en Horticulture et Semence

Mb : Un million de paires de base

KO : Knock-Out

OGM : Organisme Génétiquement Modifié

PDA : Potato Dextrose Agar

PHENOTIC : plateforme de phénotypage

p/v : poids pour volume

PTMP : Post Translationally Modified Peptides

RE : réticulum endoplasmique

RNA-seq : méthode de Séquence d'ARN

SCOOP : Serine-riCh endOgenOus Peptides

SFR QUASAV : Structure Fédérative de Recherche « Qualité et Santé du Végétal »

SONAS : Substances d'Origine Naturelle et Analogues Structuraux

TAIR : The Arabidopsis Information Resource

UMR : Unité Mixte de Recherche

WT : Wild-Type, souche sauvage

Table des matières

CARACTERISATION DE LA SENSIBILITE DE MUTANTS DE PEPTIDES

1.	Introduction.....	1
1.1.	Structure d'accueil	1
1.2.	Mise en contexte.....	2
1.3.	Objectif du stage et missions confiées	5
2.	Matériel et Méthodes	6
2.1.	Matériels biologiques et conditions de cultures	6
2.1.1.	Matériel végétal	6
2.1.2.	Matériel fongique	6
2.2.	Méthode de l'analyse sur jeunes plantules	7
2.2.1.	Contamination artificielle de graines d' <i>A. thaliana</i> via macération	7
2.2.2.	Comparaison de la germination et quantification des symptômes	15
2.3.	Protocole de l'analyse sur feuilles de rosettes	9
2.3.1.	Préparation et mise en cultures des plantes	17
2.3.2.	Inoculation des plantes.....	19
2.3.3.	Traitement et analyse des images acquises	19
3.	Résultats.....	12
3.1.	Analyse sur jeunes plantules	12
3.1.1.	Étude de la germination des mutants en présence d'Abra 43	12
3.1.2.	Étude des symptômes sur plantules en présence d'Abra 43	13
3.2.	Analyse sur feuilles	14
4.	Discussion.....	15
5.	Conclusions et perspectives	17
6.	Bibliographie.....	19

Table des figures

Figure 1 : Classification des peptides sécrétés selon leurs caractéristiques structurales

Figure 2 : Taux de germination 6 jours après le semis sur gélose eau 0,8% des différents mutants de peptides sécrétés inoculés avec *Alternaria brassicicola*

Figure 3 : Notation du niveau des symptômes 6 jours après le semis sur gélose eau 0,8% des différents mutants de peptides sécrétés contaminé avec *Alternaria brassicicola*

Figure 4 : Surface foliaire (mm²) des différents mutants de peptides d'*Arabidopsis thaliana* âgés de 5 semaines estimées à partir de la segmentation obtenue sur le logiciel Ilastik

Table des tableaux

Tableau I : Liste des gènes d'intérêts codant pour des peptides sécrétés identifiées par transcriptomique après inoculation avec Abra43 et caractéristiques des mutants d'insertion sélectionnés

Tableau II : Illustration et description de l'échelle d'évaluation visuelle (EEV) utilisée pour déterminer l'intensité des symptômes observés sur les parties aériennes des plantules

Table des annexes

Annexe I: Comparaison des différents génotypes 7 jours après le semis sur gélose eau 0,8% des différents mutants de peptides sécrétés d'*Arabidopsis thaliana* inoculés avec *Alternaria brassicicola*

Annexe II : Comparaison visuelle des différents mutants de peptides sécrétés d'*Arabidopsis thaliana* 5 semaines après le semis (avant l'inoculation)

Annexe III: Visualisation des surfaces foliaires et des nécroses une semaine après inoculation ou non d'*Alternaria brassicicola* sur des feuilles d'*Arabidopsis thaliana* âgées de 5 semaines

Caractérisation de la sensibilité de mutants de peptides

1. Introduction

1.1. Structure d'accueil

Ce présent mémoire porte sur un stage réalisé au sein de l'Institut de Recherche en Horticulture et Semences (IRHS) situé à Beaucouzé (49). Ce centre est le résultat de la fusion en 2012 de 4 unités mixtes de recherches (UMR) qui réunit depuis 2012 quatorze équipes de recherche sous la tutelle de l'Institut National de Recherche pour l'Agriculture, l'alimentation et l'environnement (INRAE), et l'Institut Agro Rennes Angers (IARA) et de l'Université d'Angers. L'unité emploie près de 270 agents, chercheurs et enseignants chercheurs, ingénieurs, techniciens, doctorants et post-doctorants. Son budget annuel avoisine 2,7 millions d'euros (hors salaires publics), 75% issus de financements par projet.

L'IRHS est intégrée à la Structure Fédérative de Recherche Qualité et Santé du Végétal (SFR QUASAV) qui fédère l'ensemble des unités de recherche de la région Pays de la Loire. D'autres laboratoires de la SFR QUASAV, comme le SONAS (Substances d'Origine Naturelle et Analogues Structuraux), y sont également implantés, favorisant les échanges et l'innovation par la mutualisation des savoirs et des compétences, des expertises (en génétique, génomique, sélection, phytopathologie, physiologie, biochimie, bioinformatique et statistiques) ainsi que des ressources avec à disposition une plateforme de phénotypage (PHENOTIC) et trois plateaux techniques (Analyses des Acides nucléiques (ANAN), Imagerie cellulaire (IMAC), Collection de microorganismes (COMIC)).

Sa mission est d'œuvrer à la production et la diffusion de connaissances concernant les problématiques de santé et de qualité et des productions horticoles. Les recherches menées visent une compréhension fine des processus déterminants dans le développement, l'acquisition de la qualité et les résistances aux stress chez des plantes cultivées dans l'objectif d'améliorer l'efficacité des systèmes horticoles.

Mon stage s'est déroulé au sein de l'équipe FungiSem dont les travaux portent sur les pathogènes fongiques des semences visant à identifier les mécanismes de leur transmission à et par la semence mais aussi à comprendre le rôle du microbiote de la semence dans cette propagation. L'équipe développe des projets de recherche concernant des méthodes de lutte innovantes en vue de réduire l'utilisation des pesticides de type fongicides, notamment en les remplaçant par des agents de biocontrôle, des biostimulants ou encore en réalisant de l'amélioration des résistances.

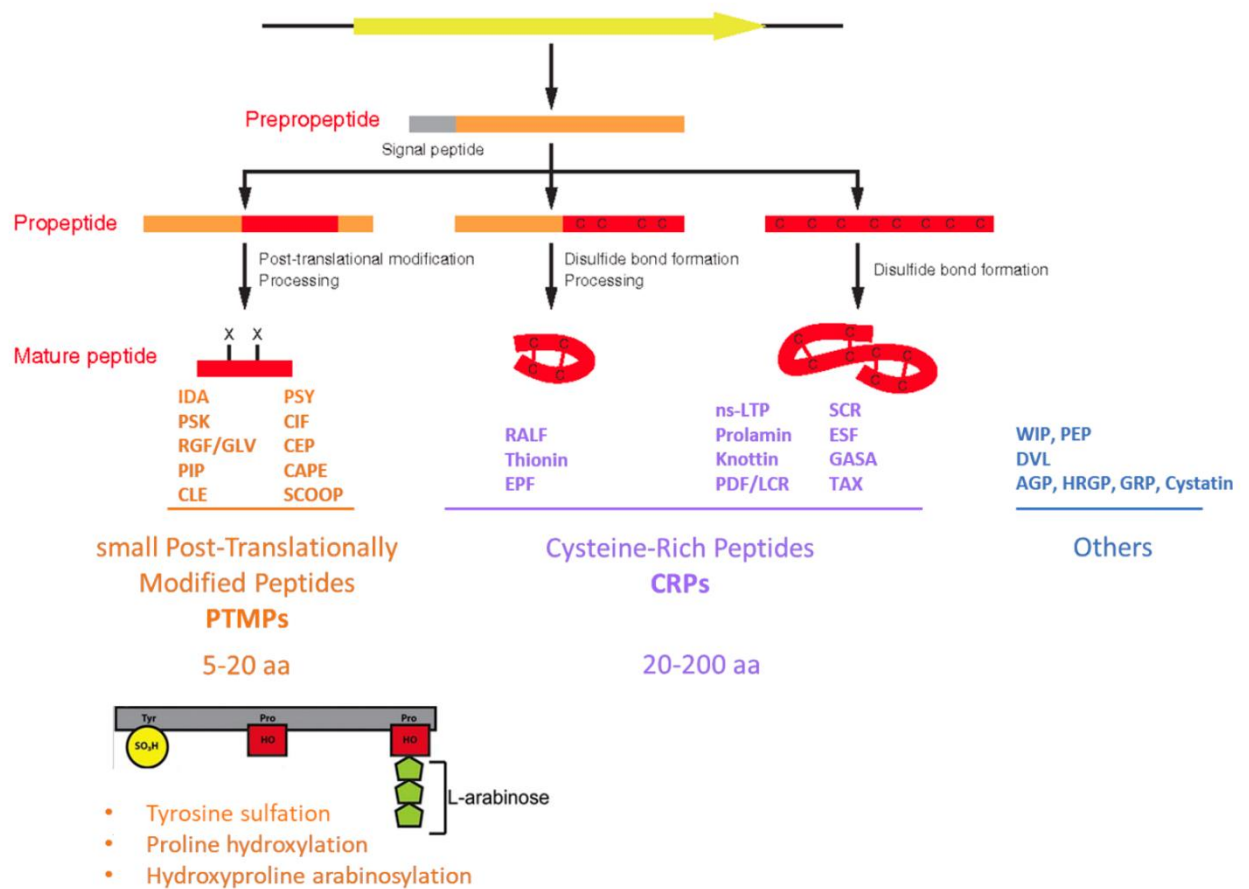


Figure 1 : Classification des peptides sécrétés selon leurs caractéristiques structurales

Les peptides qui subissent des modifications post-traductionnelles complexes, suivies de modifications protéolytiques, sont définis comme des petits peptides modifiés post-traditionnellement (PTMP, en orange). Les peptides qui subissent la formation de liaisons disulfures intramoléculaires sont définis comme des peptides riches en cystéine (CRP, en violet). En bleu, d'autres peptides sécrétés qui ne peuvent pas être classés dans l'un de ces deux groupes. Tiré de la thèse de Guillou (2022), elle-même adapté de Matsubayashi (2010) et Murphy *et al.*, (2012).

1.2. Mise en contexte

Contrairement à la plupart des êtres vivants, les plantes sont des organismes sessiles. Celles-ci ont dû développer au cours de leur évolution un ensemble de mécanismes adaptatif pour faire face aux contraintes d'origine biotique et abiotique qu'elles rencontrent. La problématique des dommages causés aux cultures par le stress biotique va s'accroître avec les changements climatiques à venir et constitue un enjeu de suffisance alimentaire à l'échelle mondiale. Les bio-agresseurs causent près de 30% de perte des productions agricoles (Savary *et al.*, 2019). Il devient ainsi primordial de comprendre les mécanismes les plus fins qui permettent le contrôle de la défense des plantes contre les agressions extérieures.

Ainsi, lorsqu'une plante est attaquée par un agent phytopathogène, elle perçoit rapidement cette menace, ce qui déclenche une série de modifications métaboliques dans les cellules pour alerter les cellules voisines et mettre en place des stratégies de défense rapides, parfois spécifiques (Benhamou *et al.*, 2012). Ces réponses des plantes aux ravageurs et aux pathogènes sont coordonnées par des protéines régulatrices et des hormones et associées à des changements massifs dans l'expression des gènes (Buscaill et Rivas, 2014).

Parmi ces acteurs, de petits peptides sécrétés*, également appelés phytohormones peptidiques ou phytocytokines, peuvent interagir directement avec les pathogènes ou agir dans la signalisation et la communication intercellulaire par le biais d'interactions ligand-récepteur (Marmioli et Maestri, 2014 ; Gust *et al.*, 2017). L'implication de certains de ces peptides dans les interactions entre la plante et l'agent pathogène reste à décrire, et sera envisagé dans le cadre de mon stage à l'aide d'approches de génétique fonctionnelle.

Ces peptides sont produits à partir de précurseurs protéiques via un processus de maturation post-traductionnelle (Figure 1). Plus précisément, les peptides sécrétés chez les plantes sont de petites protéines de 5 à 200 acides aminés (aa) dérivant initialement d'un précurseur protéique inactif appelé pré-propeptide d'une taille plus importante (De Coninck *et al.*, 2016). Ce pré-propeptide possède une région à l'extrémité N-terminale correspondant au peptide d'adressage qui est responsable de l'adressage du pré-propeptide au réticulum endoplasmique (RE). Une fois dénué de son peptide d'adressage et internalisé dans le RE, la séquence restante correspond à celle d'un propeptide qui subira alors un processus de maturation pour donner un peptide mature sécrété en dehors des cellules.

Ces peptides sécrétés sont généralement classés dans deux groupes distincts : (i) les petits peptides modifiés (5 à 20 aa environ) qui sont les cibles de modifications post-traductionnelles, Post Translationally Modified Peptides (PTMP) (Murphy *et al.*, 2012) et les (ii) Cystein Rich Peptides (CRP) (jusqu'à 200 aa), qui sont caractérisés par un nombre important de résidus cystéines impliqués dans des ponts disulfures intramoléculaires (Tavormina *et al.*, 2015) (Figure 1).

Une trentaine de petites familles de gènes principalement réparties dans ces deux classes principales sont décrites chez les plantes avec une connaissance partielle de leurs fonctions biologiques (Tavormina et al., 2015). La plupart des peptides sécrétés connus à ce jour contribuent à la croissance et au développement des plantes, certains d'entre eux sont également impliqués dans les mécanismes de défense des plantes (Albert, 2013). En effet, certains peptides antimicrobiens de la classe des CRP (tels que les knottines et les défensines) interagissent avec les membranes cellulaires des pathogènes et les perturbent (Goyal et Mattoo, 2014). Plus récemment encore, il a été démontré que des peptides de la famille des Serine-rich endogenous Peptides (SCOOP), identifiés chez la plante modèle *Arabidopsis thaliana*, jouent des rôles multiples. En effet, en plus de leur rôle dans l'induction des voies de défenses face à de multiples bioagresseurs, des fonctions ont été identifiées dans des processus développementaux. Ainsi, PROSCOOP12 contrôle l'élongation et la division des cellules, via le métabolisme des espèces réactives de l'oxygène, pour réguler le développement de la racine principale. Le gène PROSCOOP10 joue quant à lui un rôle dans la transition florale (Guillou, 2022).

Malgré l'importance évidente des peptides sécrétés notamment dans les interactions plante-pathogène, seule une petite fraction a été biologiquement caractérisée, leur diversité et leur impact sont encore grandement sous-estimées. Ces familles de peptides sont identifiées de manière hypothétique dans les génomes par des modèles de prédictions bioinformatique. Par ailleurs, la petite taille des gènes codant ces peptides sécrétés, la faible conservation des séquences et de la difficulté d'identifier le peptide mature final produit par le traitement protéolytique sont les principales raisons de la difficulté de leur étude (Silverstein et al., 2007 ; Boschiero et al., 2020).

Mon stage s'inscrit dans le projet de l'Agence National de la Recherche (ANR) STRESS-PEPT qui a pour objectif de caractériser chez *Arabidopsis* des peptides de différentes familles sur la base d'analyse transcriptomique et d'engager une analyse de leur potentiel rôle dans les interactions avec différents agents pathogènes. L'objectif principal de ce programme de recherche est d'identifier de nouveaux peptides sécrétés chez *Arabidopsis thaliana* et de comprendre comment ils influencent la réponse aux agressions de différents agents pathogènes biotrophes et nécrotrophes (oomycètes, champignons, et bactéries). Pour cela, une identification à l'aide d'un pipeline bio-informatique des gènes pouvant potentiellement synthétiser des peptides sécrétés a d'abord été réalisé. Puis, une approche différentielle par séquençage d'ARN (RNA-seq) extraits de feuilles âgées de 5 semaines de rosettes de plantes d'*Arabidopsis thaliana* en présence et en absence de différents pathogènes a été effectué. Ceci a permis d'identifier des gènes candidats codant pour des précurseurs de peptides sécrétés qui sont régulés au niveau transcriptionnel par les différents stress biotiques. Cette approche a notamment été utilisé à l'IRHS, avec le champignon nécrotrophe, modèle d'étude de l'équipe FungiSem : *Alternaria brassicicola* (*A. brassicicola*) (Pochon et al., 2012).

A. brassicicola, est un ascomycète nécrotrophe*, de la classe des Dothideomycètes, famille des Pleosporaceae. Il s'agit d'un agent pathogène spécifique des Brassicacées (Guillemette *et al.*, 2014). Ainsi, une grande des Brassicacée cultivées qui sont destinées à la consommation humaine (radis, colza, navet, chou, moutarde) sont également la cible d'*A. brassicicola* (Joubert, 2011). Celui-ci ne présente pas de forme de reproduction sexuée connue, mais se multiplie par voie asexuée, par génération de conidies*. Il forme avec *A. brassicae* et *A. japonica* un complexe de trois espèces causant la maladie de la « tâche noire », aussi appelée « black spot » (Iacomi-Vasilescu *et al.*, 2002).

L'une de ses plantes hôtes est *Arabidopsis thaliana*. Elle constitue un outil de choix notamment grâce à sa petite taille, son cycle de développement relativement court (8 semaines en moyenne). Cette plante modèle peut être facilement cultivée en enceinte climatique, permettant de contrôler les conditions de cultures et d'optimiser la bonne reproductivité des résultats. Elle possède une sexualité gynodioïque* dont la reproduction naturelle est l'autofécondation mais il est aisé de pratiquer des croisements de manière artificielle (Guillou, 2022). *Arabidopsis thaliana* est également la plante qui possède le plus petit génome nucléaire végétal séquencé : 125 Mb réparties sur un total cinq chromosomes, soit un accès centralisé aux données de près de 30000 gènes codants sur la base de données en ligne « The Arabidopsis Information Resource » (TAIR) (Berardini *et al.*, 2015). De plus, celle-ci possède l'énorme avantage d'être facilement transformée en routine à l'aide d'*Agrobacterium tumefaciens*, permettant le transfert d'ADN (ADN-T) dans le génome grâce à des protocoles simples. En s'intégrant aléatoirement, l'ADN-T permet la modulation du niveau de transcription de certains gènes (surexpression ou sous expression) pouvant aller jusqu'à l'inactivation de gènes qui sont alors qualifiés de mutant Knock-out (KO). Cette technique de transformation a permis de générer plusieurs collections de mutants d'insertions aléatoires, contenant plus de 300 000 lignées transgéniques indépendantes (Alonso *et al.*, 2003). L'ensemble de ces informations et ressources biologiques (séquences, écotypes, lignées, graines, expression des gènes, annotations, etc.) sont stockées dans différentes bases de données (TAIR, Thalemine...) et par différents centres de ressources biologiques (Pochon, 2012). Tous ces éléments permettent l'utilisation de cette plante comme organisme modèle dans les laboratoires de recherche, et ce notamment pour la caractérisation de nouvelles fonctions des gènes.

C'est ainsi que lorsque des gènes individuels codant pour des peptides sécrétés ont été clairement définis dans l'interaction avec *Alternaria brassicicola*. Des mutants d'insertion dans des gènes codant pour des peptides candidats, identifiés pour leur régulation au niveau ARN associée à l'infection par *A. brassicicola* ont été commandés auprès de ces centres de stockage publics. Ces mutants de fond génétique Columbia-0 (Col-0)) ont été sélectionnés jusqu'à l'obtention de lignées homozygotes pour le gène d'intérêt dans le but d'une analyse phénotypique de leur sensibilité dans l'interaction avec *Alternaria brassicicola* (Tableau I).

1.3. Objectif du stage et missions confiées

C'est dans le cadre du projet ANR STRESS-PEPT visant à caractériser des peptides de plantes induits par les agents pathogènes et à étudier leur rôle dans les interactions biotiques que s'inscrivent les objectifs de mon stage. La finalité globale du stage sera notamment de mettre en évidence le potentiel rôle de ces peptides sécrétés dans le développement et la réponse immunes de la plante et sa résistance à l'agent pathogène *A. brassicicola*. Mon objectif est de caractériser phénotypiquement la réponse à l'infection par ce champignon sur des jeunes plantules (stade post-germinatif) et des feuilles de rosettes (stade de développement plus tardif) chez des mutants d'*Arabidopsis* potentiellement affectés dans l'activité des gènes codant pour des peptides sélectionnés sur la base de l'analyse RNAseq décrite ci-avant... Le choix de ces deux stades de développement est motivé par l'hypothèse que la réponse immunitaire à un stade post germinatif diffère de celle à des stades de développement plus tardifs (Ortega-Cuadros *et al.*, 2022).

Pour cela, la germination ainsi que la sensibilité des différents mutants en présence de la souche d'*A. brassicicola* *Abra43* au stade post-germinatif (J+6). Par ailleurs, l'analyse des symptômes sur feuilles de rosette âgé de 6 semaines sera réalisé en utilisant une méthode de quantification des symptômes par reconnaissance d'images (Barrit *et al.*, 2022). La mesure des symptômes des nécroses chez les mutants comparés à celle du témoin sauvage permettra d'appréhender l'implication des peptides, dont l'activité a été génétiquement affectés, dans l'interaction entre *A. thaliana* et *A. brassicicola*.

Tableau I : Liste des gènes d'intérêts codant pour des peptides sécrétés identifiées par transcriptomique après inoculation avec Abra43 et caractéristiques des mutants d'insertion sélectionnés.

L'expression différentielle des gènes identifiés par analyse RNAseq d'extraits de feuilles chez les plantes d'*Arabidopsis thaliana* (fond Col-0) âgées de 5 semaines inoculés avec Abra 43 comparativement aux plantes non inoculées est représenté par le code couleur : rouge (induction par Abra43), vert (répression par Abra43), bleu (pas de différence significative). Le numéro des lignées mutantes pour ces gènes. L'expression transcriptomique a été mesurée à 1, 2 et 4 jours après l'inoculation.

Gènes	famille des gènes	Expression des gènes chez Col-0 après inoculation avec Abra 43			mutants STRESS-PEPT
		1 jour	2 jours	4 jours	
gène A	C-terminally Encoded Peptide [CEP]				lignée 31
					lignée 34
gène B	non déterminé				lignée 6
					lignée 35
gène C	Scorpion toxin-like knottin, Trypsin Inhibitor				lignée 2'
					lignée 25
gène D	DUF538				lignée 12
					lignée 32
gène E	non déterminé				lignée 1
gène F	ECS1-like				lignée 33
gène G	Plant Defensin Family (-Like), LMW Cysteine-Rich [PDF, LCR]				lignée 6'
gène H	(Cysteine-rich, Antigen5, PR1 protein)-derived peptide [CAP]			-0,897368	lignée 13

2. Matériel et Méthodes

2.1. Matériels biologiques et conditions de cultures

2.1.1. Matériel végétal

Un total de douze mutants homozygotes d'*Arabidopsis thaliana* a été utilisé pour les différentes expérimentations (Tableau I). Il faut noter que nous disposions d'une quantité très réduite de graines (200 à 300 graines en moyenne par génotype issues d'une même production). Seuls les mutants d'insertion dans la partie 5'UTR et dans la séquence codante ont été utilisés avec l'hypothèse restant à confirmer que ces gènes sont inactivés par la présence de l'insertion. Plusieurs de ces mutants d'insertion affectent le même gène et permettent de disposer de plusieurs allèles : le mutant de la lignée 31 et le mutant de la lignée 34 possèdent des ADN-T qui s'insèrent dans le « gène A », les mutants des lignées 6 et 35 affecteraient le « gène B », le mutant 2' et le mutant 25 possèdent quant à eux des ADN-T qui s'insèrent dans le « gène C », les lignées mutantes 12 et 32 affecteraient quant à elles le « gène D ». Enfin, les 4 derniers mutants 1, 33, 6', 13 possèdent des ADN-T qui s'insèrent respectivement dans les « gènes E ; F ; G et H ». Il est à noter que l'analyse transcriptomique (réalisée en amont de mon stage) a permis d'identifier que le « gène H » était réprimé par *A. brassicicola*, tandis que l'ensemble des autres gènes considérés étaient induits comparé au témoin (même génotype non inoculé). Une analyse de l'expression des gènes d'intérêt chez les lignées mutantes est en cours.

Par ailleurs, l'écotype Col-0 non muté a servi de témoin pour l'ensemble des expérimentations (fond génétique dans lequel les mutants ont été générés).

2.1.2. Matériel fongique

Pour l'ensemble des expérimentations menées, les inoculations ont été réalisées avec la souche sauvage 43 d'*A. brassicicola* (*Abra43* WT) – (isolée à partir de semences de radis en 2001 - Iacomi-Vasilescu *et al.*, 2002). Les souches sont maintenues par repiquages successifs sur un milieu PDA (Potato Dextrose Agar : extrait de pomme de terre 0,4% poids pour volume (p/v) ; glucose 2% (p/v) et agar 1,5% (p/v)) à 24°C.

2.2. Méthode de l'analyse sur jeunes plantules

2.2.1. Contamination artificielle de graines d'*A. thaliana* via macération

L'ensemble des étapes qui suivent ont été effectué sous Poste de Sécurité Microbiologique (PSM).

Pour cette première expérimentation, des conidies provenant d'une boîte de pétri d'*Abra43* âgée d'une semaine sont récupérées dans de l'eau stérile par grattage de la culture mycélienne à l'aide d'une lame de scalpel stérile. La suspension est ensuite calibrée à 10^4 conidies/ml par comptage à l'aide d'une cellule de Thoma.



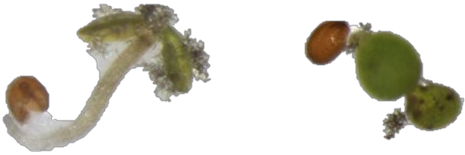
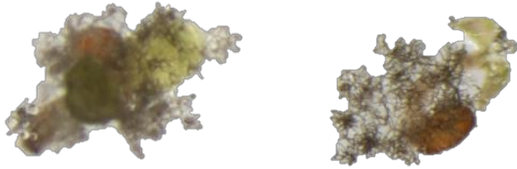
Ensuite, 3 mg de graine (soit environs 200 graines) par génotype ont été pesés et échantillonnés pour faire l'objet d'inoculation par *Abra43*. En raison du nombre très limité de graines et de la sensibilité potentiellement accrue des mutants à un traitement de désinfection (Gilbert *et al.*, 2023), il a été décidé de ne pas réaliser de stérilisation des graines.

Les échantillons de graines ont ensuite été placés dans des microtubes dans lesquels est ajouté 1mL de la solution d'inocula précédemment préparé, puis laissées à macérer pendant une heure sur une roue rotative permettant une bonne homogénéisation du mélange conidies/graines. Les graines ont ensuite été prélevées à l'aide d'une pipette P1000 (dont le cône a été découpé pour laisser passer les graines), puis déposées sur un papier buvard autoclavé et déposé dans une boîte de Pétri. Les graines, une fois déposées sur buvard, sont laissées à sécher pendant 16 heures sous PSM.

L'incubation des semences sera réalisée en boîte de Petri sur milieu agar (10 ml / boîte d'un milieu à 0,8% agar bactériologique type A et eau miliQ). Après une nuit de séchages des échantillons de semences inoculées les graines sont séparées et détachées délicatement du papier buvard à l'aide d'un cure-dent stérile pour être ensuite déposé sur le milieu agar. Afin d'avoir un dépôt homogène des graines dans les boîtes, un patron de 4 carrés de 25 graines par condition est utilisé pour le semi. Ce format a été adapté pour séparer l'échantillons en 4 répétitions techniques et pour optimiser la prise d'image au microscope.

Tableau II : Illustration et description de l'échelle d'évaluation visuelle (EEV) utilisée pour déterminer l'intensité des symptômes observés sur les parties aériennes des plantules

L'échelle intègre la colonisation par le mycélium et la zone nécrotique sur les cotylédons et l'hypocotyle, et était basée sur un score allant de 0 à 3 (aucun symptôme à 100%)

Illustration de plantules représentatives	Description visuelle de l'évaluation
	<p><u>Note = 0 :</u></p> <p>Pas de colonisation mycélienne, ni de nécrose ; Plantule bien dressée</p>
	<p><u>Note = 1 :</u></p> <p>Début de colonisation fongique sur les cotylédons et hypocotyles (des petites taches nécrotiques sont visibles) ; Plantule généralement penchée</p>
	<p><u>Note = 2 :</u></p> <p>Colonisation mycélienne importante et/ou nécroses de tailles intermédiaires</p>
	<p><u>Note = 3 :</u></p> <p>Plantules très fortement nécrosés ou chlorosés</p>

2.2.2. Comparaison de la germination et quantification des symptômes

Le taux de germination des graines a été évalué au microscope oculaire : 30 heures, 46 heures, 54 heures, 120 heures (5 jours), 144 heures (6 jours) et 168 heures (7 jours) après le dépôt sur boîtes.

L'analyse statistique des résultats du taux de germination final (6 jours après le semi) est réalisée avec le logiciel R avec le package GerminaR grâce au package GerminaR associé à l'interface interactive web « GerminaQuant for R » (Lozano-Isla *et al.*, 2019) spécifiquement conçu pour étudier ce type de donnée et consiste en une ANOVA suivie d'un test post-hoc de Tukey (Différence Significative Honnête ou DSH) avec un seuil de significativité de 5%. D'autres packages ont également été utilisés pour la mise en forme de la représentation graphique : dplyr (in tidyverse), ggplot2.

Les symptômes de nécroses sur les plantules infectées ont pu être observés au microscope du plateau IMAC et des acquisitions d'images semi-automatisées ont été réalisées à 5, 6 et 7 jours au grossissement 3,5 puis 8 avec l'objectif 0,5X.

Ensuite, une annotation manuelle et de la sensibilité des mutants est évaluée à partir de l'observation des images. Une échelle d'évaluation visuelle (EVR) a été utilisée pour évaluer le niveau symptômes observés sur les parties aériennes de chaque plantule (Tableau II). Une moyenne de la du niveau des symptômes est alors calculé de la manière suivante pour chacun des quatre carrés de chaque génotype.

$$\text{Moyenne de la gravité des symptômes sur plantule} = (N0 * 0 + N1 * 1 + N2 * 2 + N3 * 3) / NT$$

Avec :

N0 : Nombre de plantules ayant des symptômes de niveau 0 dans un carré pour un génotype

N1 : Nombre de plantules ayant des symptômes de niveau 1 dans un carré pour un génotype

N2 : Nombre de plantules ayant des symptômes de niveau 2 dans un carré pour un génotype

N3 : Nombre de plantules ayant des symptômes de niveau 3 dans un carré pour un génotype

NT : Nombre total d'individu au stade plantule dans un carré pour un génotype (= N0+N1+N2+N3)

L'analyse statistique des résultats de la gravité des symptômes sur plantules (6 jours après le semi) chez les différents mutants de peptides contaminés par *Abra* 43 est réalisée avec le logiciel R (packages dplyr (in tidyverse), rstatix, ggpubr, ggplot2) et consiste en une ANOVA suivie d'un test post-hoc de Tukey (Différence Significative Honnête ou DSH), avec un seuil de significativité de 5%. S'agissant d'un test paramétrique, la normalité de la variable « gravité des symptômes » chez l'ensemble des mutants est vérifiée au préalable par un test de Shapiro-Wilk et l'homoscédasticité est contrôlée visuellement par une représentation des résidus en fonction des valeurs prédites.

Les deux analyses statistiques ne prennent pas en considération le mutant 31 puisqu'un seul carré de 25 a pu être réalisé (contre 100 pour l'ensemble des autres génotypes) et cela en raison du nombre trop limité de graine disponible pour ce génotype.

2.3. Protocole de l'analyse sur feuilles de rosettes

Pour la caractérisation de la sensibilité à *la souche Abra43* sur feuille aux stade rosette, quatre répétitions biologiques vont être effectués. À l'écriture de ce rapport, seulement un répliqua biologique a pu être réalisé.

2.3.1. Préparation et mise en cultures des plantes

Pour chaque génotype, 12 jeunes plants sont produits dans du terreau (Traysubstrat : mélange de tourbe blonde et noire, recette 092, Klasmann, Brème, Allemagne) arrosé jusqu'à saturation en eau du substrat pour une meilleur efficacité des futures inoculations). Un traitement biologique à base de nématodes est appliqué dans chacun des pots pour prévenir des mouches de terreaux. Les graines sont déposées à l'aide d'un cure-dent dans chacun des pots et sont humidifiées en surface à l'aide d'un pulvérisateur. Les plateaux de semis sont recouverts d'un couvercle et d'un sac plastique noir scellé pour maintenir une humidité relative élevée dans le milieu. Les pots sont placés à l'obscurité, à 4°C pendant 2 jours pour permettre une stratification des graines. Après deux jours, les sacs plastiques sont retirés et les plateaux sont placées en chambre de culture en conditions contrôlées (21°C, en condition de jour court, 80% d'hygrométrie). Au bout d'une semaine, les couvercles sont enlevés puis un éclaircissage est effectué, pour ne laisser qu'une seule plantule par pot. Les plantes sont cultivées quatre semaines de plus dans ces mêmes conditions avec un arrosage lorsque le substrat devient sec.

Après 5 semaines de culture, les 12 plantes de chaque génotype sont photographiées ensemble et toujours à la même hauteur (45 cm) et sur un même plan (pas de différence de niveau entre les pots) afin de pouvoir estimer a posteriori et de manière non destructive estimer la surface foliaire et le stade de développement des feuilles de rosette de chacun des individus avant l'inoculation. Les 12 pots d'un génotype sont photographiés ensemble (en gardant La largeur des pots (7cm) servira d'échelle pour l'analyse d'image.

2.3.2. Inoculation des plantes

Pour quantifier la sévérité des symptômes, la surface des secteurs de nécrose autour de la zone d'inoculation sera rapportée à la surface de la feuille de rosette prélevée à un stade de développement comparable.

Une suspension de conidies de la souche *Abra43* (d'une culture d'une semaine en milieu gélosé) sont récupérées dans de l'eau stérile par grattage de la culture mycélienne à l'aide d'une lame de scalpel stérile. La suspension est ensuite calibrée à 10^5 conidies/mL par comptage à l'aide d'une cellule de Thoma.

Parmi les 12 plantes de chaque génotype (à l'exception du mutant 31 pour lequel nous disposons d'uniquement de 5 plantes), trois feuilles de huit rosettes (répétition biologique) sont inoculées avec 1 goutte de 5 μ L de la solution calibrée à 10^5 conidies/mL, trois autres feuilles des quatre rosettes restantes vont servir de témoins négatifs inoculé avec de l'eau milliQ stérile. Pour chaque rosettes les feuilles inoculées sont celles qui présentent la surface la plus importante. Un marquage au crayon est effectué amont sur le pétiole pour identifier les feuilles inoculées de celles non inoculées. Les plateaux de plantes sont arrosés, recouverts d'un couvercle transparent, entourée d'une bâche opaque permettant de placer les rosettes à l'obscurité en humidité saturante puis incubés 48h en phytotrons (8h lumière, 22°C / 16h d'obscurité, 19°C). Après 48h, les bâches sont retirées, en gardant les couvercles et au besoin, l'eau des mini serres est vidée. Sept jours après l'inoculation, les feuilles inoculées sont détachées et placées sur un fond noir pour être prise en photo à l'intérieur d'un photocube avec un éclairage LED afin de mesurer la surface de chacun des limbes et de leur nécrose respective. Les acquisitions sont effectuées toujours à la même hauteur (30 cm) et sur chaque image est présent l'ensemble des feuilles traitées d'un même génotype et classées par individu.

2.3.3. Traitement et analyse des images acquises

Deux méthodes d'analyse d'images ont été développées pour à la fois estimer la surface foliaire des différentes lignées mutantes avant l'inoculation du champignon mais également pour quantifier les symptômes sur les différents limbes une semaine après inoculation avec *Alternaria brassicicola*. Ce protocole est directement adapté d'une méthode d'analyse d'images, développée par Julie Bourbeillon et Thibault Barrit utilisé pour suivre l'impact du champignon *A. brassicicola* sur le développement aérien de plantules d'*Arabidopsis* (Barrit et al., 2022).

Focalisons-nous d'abord sur la méthode développée pour mesurer les surfaces des saines ou symptomatiques des limbes après l'inoculation avec *Abra* 43.

Un pré-traitement des images est réalisé pour fragmenter des images acquises en diverses sous-images que l'on souhaite analyser individuellement. Ainsi, l'image d'origine présentant 36 feuilles des 12 individus d'un génotype est scinder 12 images présentant 3 feuilles. Sur les images numérisées, les pétioles de chaque feuille sont masqués par un coloriage en noir à l'aide d'une tablette graphique pour ne laisser apparaître plus que les limbes des feuilles sur la photo, les surfaces de symptômes sont quant à elles coloriées en violet. Ces images sont alors importées sur le logiciel Ilastik. Une méthode d'annotation des images est alors effectuée sur le logiciel pour l'entraîner à reconnaître le coloriage violet qui est spécifique des nécroses ainsi que les surfaces foliaires saines qui apparaissent en verts. Ce modèle est entraîné sur un maximum d'image jusqu'à l'obtention d'une segmentation réaliste des différentes régions.

Enfin une fois toutes les images segmentées par le logiciel Ilastik, celles-ci sont ensuite analysées à l'aide d'un script Python réalisés par Julie Bourbillon afin de mesurer les surfaces (en mm²) de chacun des limbes présentant ou non des symptômes. L'analyse statistique de ces données n'a pour le moment pas été réalisée.

La même méthodologie est employée à l'aide du logiciel Ilastik pour déterminer les surfaces foliaires des différents individus de chaque génotype avant l'inoculation. Toutefois, aucune étape de pré-traitement n'est nécessaire puisqu'une fois l'annotation effectuée sur le logiciel Ilastik en couplage avec un autre script Python est directement capable de reconnaître les surfaces foliaires de chacun des individus d'un même génotype et cela sur la même image.

Pour la caractérisation de la sensibilité face à *Alternaria brassicicola* sur feuille au stade rosette, quatre répétitions techniques se déroulant vont être effectués. À l'écriture de ce rapport, seulement un réplica technique a pour le moment pu être réalisé.

Les données des différents mutants de peptides sécrétés concernant la surface foliaire avant l'inoculation à 5 semaines, et de la surfaces des limbes et des nécroses une semaine après l'inoculation est ensuite traités sur le logiciel R. Seules les données de la surface foliaire avant l'inoculation à 5 semaines ont pu pour le moment être traités. Les données de la surface des limbes et des nécroses une semaine après l'inoculation ne pourront malheureusement pas être présenté dans ce rapport.

L'analyse statistique des résultats de la surface des rosettes âgées de 5 semaines (avant l'inoculation avec *Abra* 43) chez les différents mutants de peptides est réalisée avec le logiciel R (packages dplyr (in tidyverse), rstatix, ggpubr, ggplot2)). Le test de Shapiro a montré que variable « surface de certain génotype ne suivent pas la loi normale, un test non paramétrique a donc été choisi (Kruskal -Wallis). Une comparaison multiple a été faite grâce au test de Wilcoxon avec un seuil de significativité de 5% en appliquant une correction de Bonferroni.

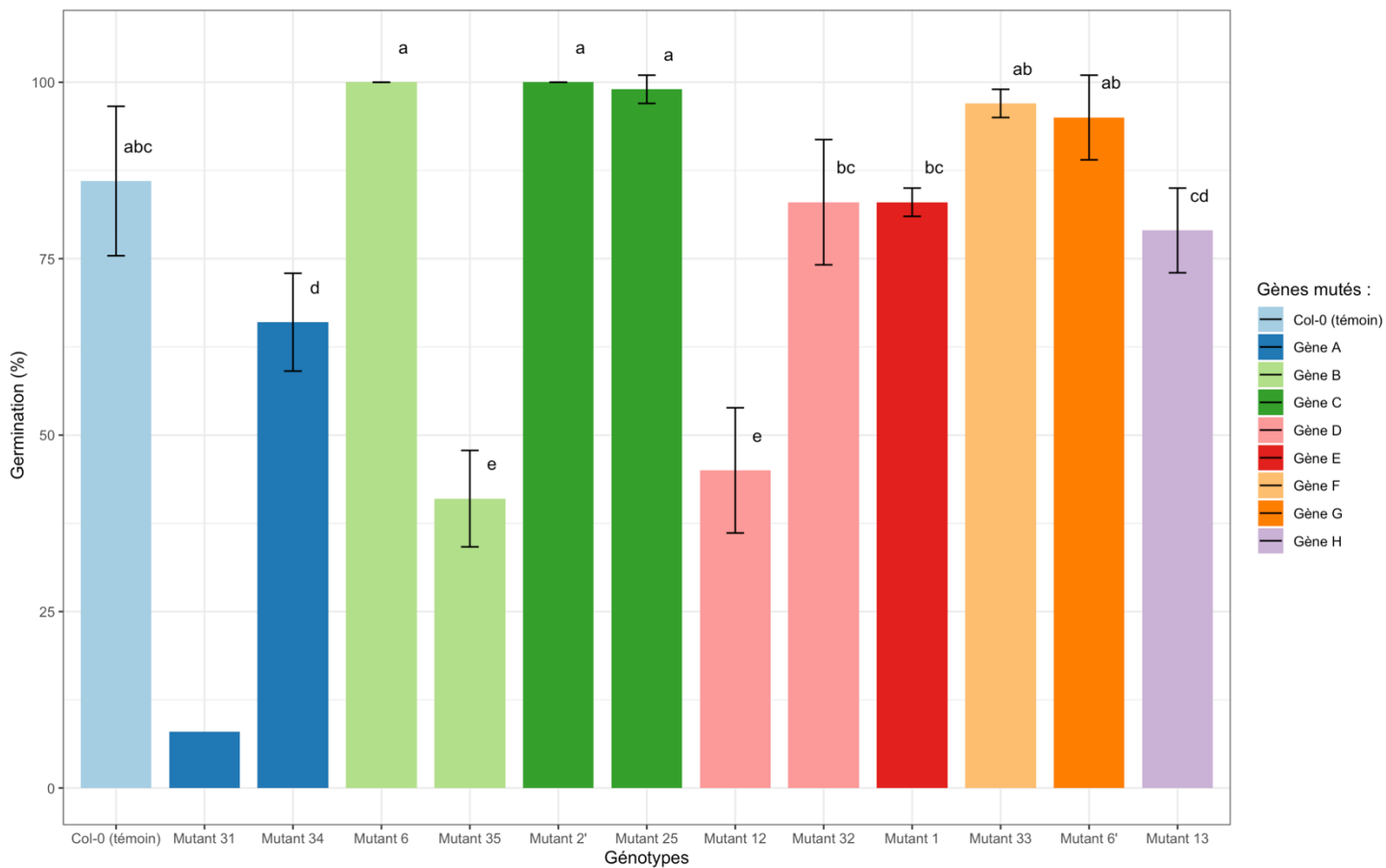


Figure 2 : Taux de germination 6 jours après le semis sur gélose eau 0,8% des différents mutants de peptides sécrétés d'*Arabidopsis thaliana* inoculés avec *Alternaria brassicicola*.

Les barres d'erreurs représentent les écart-types entre les 4 sous-groupes de 25 graines de chaque génotype. Les lettres de significativité issue du test de Tukey sont représentées au-dessus de chaque génotype. Le code couleur utilisé pour les histogrammes permet d'identifier le comportement des lignées mutantes d'un même gène. L'analyse statistique des résultats du taux de germination final (6 jours après le semi). L'analyse statistique est réalisée avec le logiciel R grâce au package GerminaR associé à l'interface interactive web « GerminaQuant for R » (Lozano-Isla *et al.*, 2019)

3. Résultats

3.1. Analyse sur jeunes plantules

3.1.1. Étude de la germination des mutants en présence d'Abra 43

Pour aborder la caractérisation des mutants, l'évolution du taux de germination au cours de l'imbibition des semences a été suivi pour ensemble des génotypes contaminés avec *Abra* 43. Le taux germination observé à 6 jours représente le taux de germination maximal (Gmax) pour l'ensemble des mutants (Figure 2).

Le sauvage (écotype Col-0) utilisé comme témoin présente un Gmax de 86%.

Par ailleurs, les mutants 6, 2', 25, 12, 32, 1, 33, 6', présentent un Gmax qui n'est pas statistiquement différent du témoin. Plus précisément, ce taux de germination moyen montre une très bonne qualité germinative des mutants 6, 2' et 25 (Gmax de 100%) et les mutants 33 et 6' (Gmax de 96%), et une relativement bonne qualité germinative chez pour les mutants 32 et 1 (Gmax de 83%).

Par ailleurs, les autres lignées mutantes 13, 34, 12, 35, 31 possèdent un Gmax significativement plus faible que celui du témoin avec respectivement un taux de germination de 79, 66, 45, 40, et 8%.

La comparaison des lignées 2' et 25 pour le « gène C », possède un taux de germination qui est statistiquement le même entre les deux (proche des 100%), à noter que ce taux important n'est pas démontré comme étant statistiquement différent du témoin Col-0.

En revanche, les deux lignées mutantes 31 et 34 du « gène A » présentent toute les deux un taux de germination plus faible que le témoin. Toutefois, une différence du taux de germination semble exister entre les deux mutant (celle-ci n'a pas pu être démontrée statistiquement en raison du nombre limité de graine pour le mutant 31). Mais ce dernier semble plus fortement affecté dans sa germination par sa mutation que la lignée 34 (Annexe I).

Le taux de germination des deux mutants 6 et 35 du « gène B » montre un comportement germinatif différent : la lignée 35 présente un Gmax inférieur à celui de la lignée 6 et du témoin. Les mutants 12 et 32 du « gène D » illustre un cas de figure similaire illustré par un Gmax du mutant 12 plus faible.

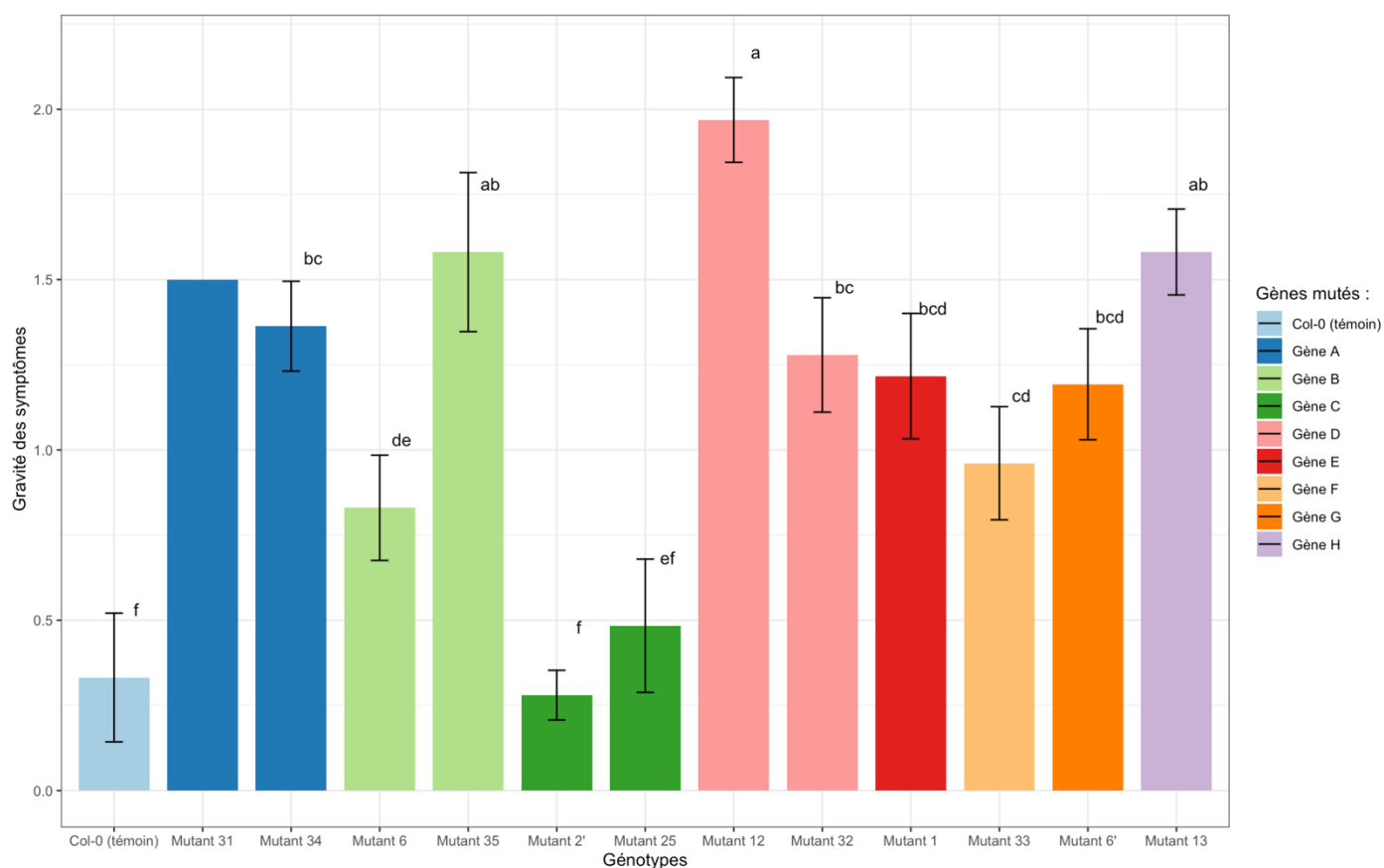


Figure 3 : Notation du niveau des symptômes 6 jours après le semis sur gélose eau 0,8% des différents mutants de peptides sécrétés d'*Arabidopsis thaliana* contaminé avec *Alternaria brassicicola*.

La notation du niveau des symptômes est effectuée avec l'Échelle d'Évaluation Visuelle (EEV). Les barres d'erreurs représentent les écart-types entre les 4 sous-groupes de 25 graines de chaque génotype. Les lettres de significativité issue du test de Tukey sont représentées au-dessus de chaque génotype. Le code couleur utilisé pour les histogrammes permet d'identifier le comportement des lignées mutantes d'un même gène.

3.1.2. Étude des symptômes sur plantules en présence d'Abra 43

L'intensité des symptômes aux niveaux des plantules à 6 et 7 jours après le semis de graines contaminées par *Abra43* montrent que dix des douze mutants de peptides de fond génétique Col-0 (mutants 31, 34, 6, 35, 12, 32, 1, 33, 6', 13) possèdent un niveau de symptômes accru par rapport au témoin sauvage (Col-0) (Figure 3 et Annexe I).

Seuls les mutants 2' et 25 n'ont pas montré de différence significative par rapport au témoin. Il est important de souligner que c'est deux mutants affectent le « gène C ».

Les deux mutants 6 et 35 du « gène B » présente quant à eux un niveau de symptômes supérieur à celui du témoin mais significativement différent entre eux, le premier est situé à 0,80 sur l'échelle d'évaluation visuelle (EEV) tandis que le second est situé à un niveau de gravité des symptômes à environ 1,6. Cette différence de symptôme entre c'est deux génotypes est clairement visible 7 jours après le dépôt sur boîte (Annexe I).

Pour les deux mutants 12 et 32 du « gène D », des résultats similaires sont observés. En effet, le mutant 32 possède un niveau moyen de symptômes de 1,25 tandis que le mutant 12 présente un niveau de symptômes de 2 sur l'échelle d'évaluation visuel. Il est important de souligner que cette lignée mutante est celle qui présente le niveau de symptômes le plus important par rapport à l'ensemble des lignées mutantes analysées.

Enfin, nous remarquons que les deux mutants du « gène A » que sont lignées mutantes 31 et 34 semblent posséder un niveau de gravité de symptôme sur plantule similaire (respectivement 1,5 et 1,4 sur l'EVV). Toutefois, il est déjà important de souligner ici qu'aucun test statistique n'a pu être utilisé pour comparer c'est deux groupes en raison du faible nombre de graine analysé pour le génotype 31.

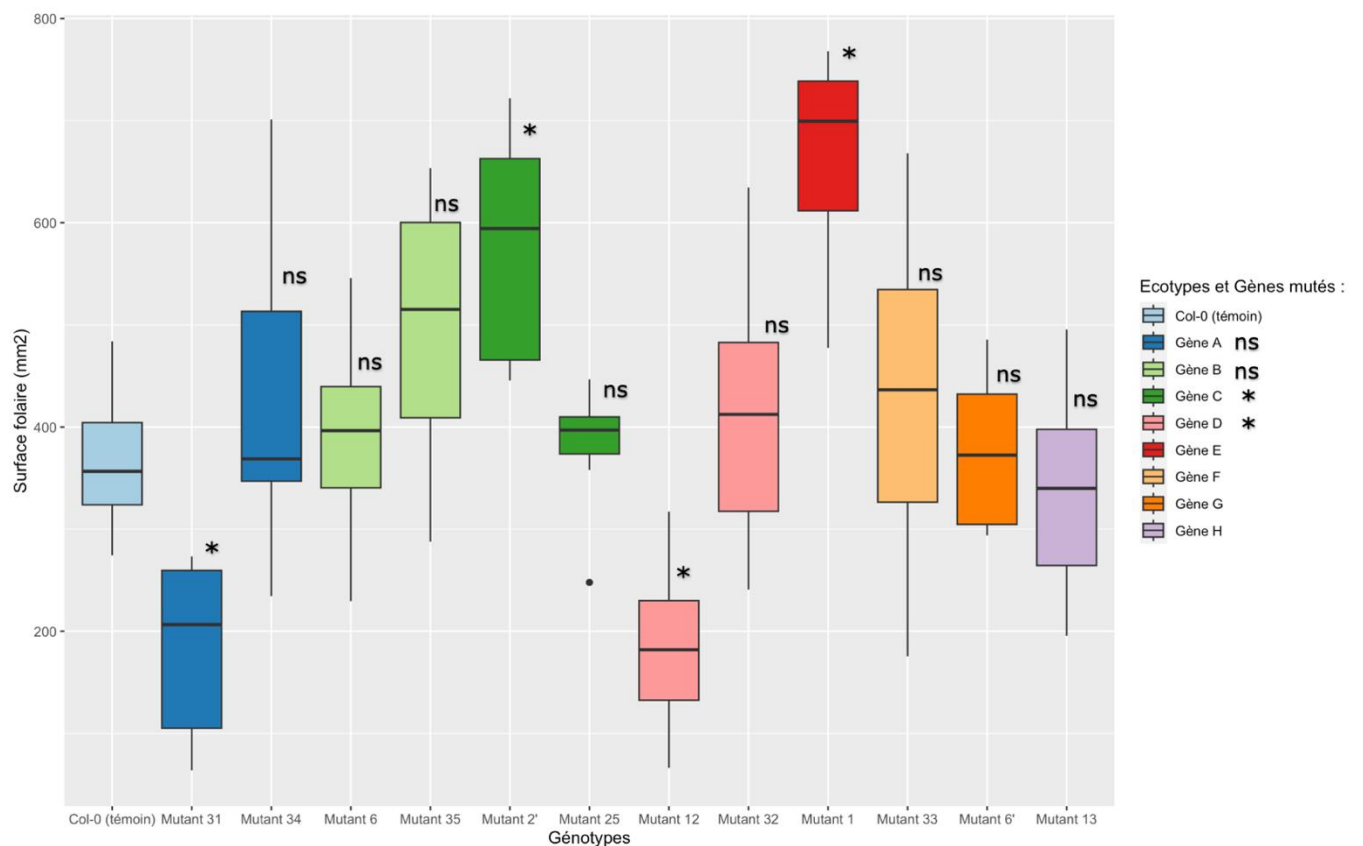


Figure 4 : Surface foliaire (mm²) des différents mutants de peptides d'*Arabidopsis thaliana* âgés de 5 semaines estimées à partir de la segmentation obtenue sur le logiciel Ilastik

La valeur centrale de chaque boîte à moustache est la valeur médiane de la surface foliaire des 12 plantes d'un génotype. Les bords du rectangle sont les quartiles. Le code couleur utilisé pour les histogrammes permet d'identifier le comportement des lignées mutantes d'un même gène.

Sur le graphique :

- « * » indique une différence significative de la surface foliaire avec le témoin sauvage.
- « ns » indique une différence non significative d'une lignée mutante avec le témoin sauvage

Dans la légende :

- « * » indique une différence significative entre les deux mutants d'un même gène
- « ns » indique une différence non significative entre les deux mutants d'un même gène

3.2. Analyse sur feuilles

L'analyse statistique des données, ainsi que l'observation visuelle des plantes (Figure 4 et Annexe 2) montre que les témoins de type sauvage (Col-0) possèdent une surface foliaire médiane d'environ 370 mm². Huit des douze génotypes de lignées mutantes ne montrent pas de différence significative comparé au témoin : il s'agit des lignées 13, 6', 33, 32, 25, 35, 6 et 34.

Quatre lignées mutantes présentent une différence significative de leur surface avec le témoin. Ainsi les mutants 2' et 1 possèdent une augmentation de la surface de leurs feuilles. La surface médiane de l'ensemble des feuilles de ces deux lignées est respectivement de 600 et 700 mm². Au contraire les mutants 12 et 31 possèdent une surfaces foliaires médiane respective de 180 et 200 mm², après 5 semaines de développement.

Les mutants 31 et 34 du « gène A » ainsi que les deux lignées mutantes 6 et 35 pour le « gène B » présentent leurs surfaces foliaires qui ne diffèrent pas significativement pour les lignées d'un même gène.

A l'inverse une différence significative de la surface foliaires entre les mutants 2' et 25 du « gène C » ainsi qu'entre les deux mutants 12 et 32 du « gène D » est observée et a été confirmé par le test de comparaison multiple.

4. Discussion

Les récentes recherches montrent que les réponses immunitaires d'*Arabidopsis thaliana* sont différentes entre un stade post germinatif précoce et le stade plus tardif précédant la montaison lorsque la rosette se développe (Ortega-Cuadros *et al.*, 2022). Nous avons donc cherché à caractériser phénotypiquement la réponse à l'infection par *A. brassicicola* sur des jeunes plantules (stade post-germinatif) et des feuilles de rosettes (stade de développement plus tardif) chez des mutants d'*Arabidopsis* potentiellement affectés dans l'activité des gènes codant pour des peptides sélectionnés sur la base d'une analyse RNAseq sur feuilles de rosettes âgées de 5 semaines.

Dans un premier temps, nous avons cherché à caractériser phénotypiquement la réponse à l'infection par *A. brassicicola* sur des jeunes plantules de 6 jours (stade post-germinatif). En raison du nombre de graines très limité mise à notre disposition et de notre objectif à comparer la réponse à *A. brassicicola* entre les génotypes mutants infectés et le témoin sauvage infecté, il a été décidé de ne pas effectuer de condition non inoculée.

Dix des douze mutants analysés ont présenté une quantité de symptôme plus importante que le témoin Col-0 non muté (Figure 3). Ainsi, seuls les deux mutants d'insertions du « gène C » n'ont pas montré de sensibilité accrue à *A. brassicicola*. Ceci semble suggérer que ce peptide sécrété codé par le « gène C » ne joue pas de rôle dans l'interaction hôte-pathogène qui aurait un effet symptomatique à ce stade physiologique 6 jours après semis. Par ailleurs, il est important de souligner les peptides sécrétés étudiés durant ce stage ont été identifiés par transcriptomique à un stade physiologique différent du stade post-germinatif. En effet, ceux-ci ont été identifiés à partir d'extrait au stade rosette (sur des feuilles âgées de 5 semaines). L'ensemble des autres mutants de peptides des « gènes A, B, D, E, F, G et H » ont présenté un niveau accru dans leurs symptômes. Le constat que les mutants affectés dans 7 des 8 gènes codants pour des peptides induits par *A. brassicicola* sur feuille de rosette, présentent une sensibilité accrue à *A. brassicicola* à un stade précoce (6 jours après le semis) illustre l'importance potentiellement générique de ces peptides dans l'interaction hôte pathogène. Ceci reste à confirmer avec les résultats de sensibilités sur feuilles de rosette.

La caractérisation germinative des mutants de peptides en présence d'*Alternaria brassicicola* a montré que les mutants 31, 35, et 12 correspondants aux gènes A, B et D sont affectés dans leur capacité germinative (Figure 2). Ces mêmes lignées présentent un niveau élevé de symptôme et il est difficile de conclure sur le phénotype de qualité germinative de ces mutants. Soit la germination est affectée, les plantules qui germent difficilement sont affaiblies et plus sujettes aux symptômes liés à l'infection, soit le niveau élevé de sensibilité des mutants à *A. brassicicola* a un impact négatif sur la germination. Pour conclure sur ce phénotype, il faudrait comparer le comportement germinatif de ces mutants en absence d'inoculation. Si cette réduction du taux est la même que ce soit en présence ou non du pathogène, le phénotype de germination serait avéré chez le mutant.

De plus, il n'est pas impossible que la méthode de transformation par ADN-T via *Agrobacterium* ait provoqué des mutations dans d'autres endroits du génome que dans le gène codant pour un peptide d'intérêt. C'est pourquoi quand cela a été possible, nous avons analysé plusieurs mutants affectés dans le même gène et que nous n'avons gardé que les mutants d'insertion dans la séquence codante ou la région 5'UTR (Région transcrite non traduite en 5' de la séquence codante).

Maintenant que nous avons discuté de l'expérimentation pour le stade plantule nous allons traiter des premiers résultats dont nous disposons concernant la caractérisation des différents mutants de peptides sécrétés au stade rosette.

Le premier point important à mentionner est de l'ordre méthodologique. En effet, nous avons réussi à adapter avec succès un protocole d'analyse d'image utilisant logiciel Ilastik initialement conçu pour quantifier les symptômes nécrotiques d'*Alternaria brassicicola* sur plantule d'*Arabidopsis* en un protocole permettant cette fois-ci d'analyser les symptômes au stade rosette (Barrit *et al.*, 2022) (Annexe II et III). Un second protocole a également été développé pour analyser la surface foliaire de plante qui nous a permis d'évaluer l'implication de certains peptides dans le développement d'*Arabidopsis thaliana*. L'utilisation de ces méthodes d'analyses pourront être envisagées en dehors du projet STRESS-PEPT. Ils pourraient d'être d'une grande utilité pour les membres de l'équipe FungiSem qui étudient ce pathosystème. En effet, l'utilisation de ces méthodes permet un gain considérable en précision par rapport aux mesures manuelles qui sont couramment utilisés.

Toujours à propos de cette analyse sur feuilles de rosettes, il a été observé que la croissance de certains mutants variait comparativement au témoin (Figure 4). Les mutants 31 et 12 présentaient un retard de développement contrairement aux lignées mutantes 2' et 1 qui elles possédaient une croissance plus importante que le témoin Col-0 non muté. Ces résultats ont permis d'identifier un effet probable de la mutation des gènes A, C, D, E sur la croissance.

5. Conclusions et perspectives

C'est dans le cadre du projet ANR STRESS-PEPT visant à caractériser des peptides de plantes induits par les agents pathogènes et à étudier leur rôle dans les interactions biotiques que se sont inscrit les objectifs de mon stage. Nous avons été capable de mettre en évidence phénotypiquement la réponse à l'infection par *Alternaria brassicicola* sur des jeunes plantules (stade post-germinatif) et des feuilles de rosettes (stade de développement plus tardif) chez des mutants d'*Arabidopsis thaliana* potentiellement affectés dans l'activité des gènes codant pour des peptides sélectionnés sur la base de l'analyse RNAseq sur feuille de rosette.

Pour l'analyse au stade post-germinatif (J+6). Nous avons mise en évidence l'implication potentielle de 7 des 8 gènes (gènes A, B, D, E, F, G, H) codant des peptides sécrétés dans le contrôle de la sensibilité d'*A. thaliana* contre *A. brassicicola* (Figure 3). 3 gènes (gènes A, B et D) codant pour des peptides sécrétés pourraient également être impliqués dans la capacité germinative de cette plante modèle (Figure 2).

Par ailleurs, pour l'analyse au stade rosette, nous avons été capable de mettre au point une méthode de quantification de la surface foliaire et des symptômes par reconnaissance d'images (Annexes II et III). L'analyse de la surface foliaire des mutants de peptides avant l'inoculation avec *Alternaria brassicicola* a permis d'identifier un effet probable de la mutation des gènes A, C, D, E sur la croissance (Figure 4). Les résultats de mesures des symptômes des nécroses qui seront prochainement analysés permettront d'appréhender l'implication des peptides, dont l'activité a été génétiquement affectés, dans l'interaction entre *Arabidopsis thaliana* et *A. brassicicola* à ce stade rosette. L'analyse des répétitions techniques qui seront effectués prochainement durant mon stage permettront de confirmer ou non cette analyse à un stade tardif.

L'activité des allèles mutés des différents gènes de peptide sécrétés que nous avons étudié pendant ce stage est en cours d'analyse. Il sera primordial de vérifier que les mutants sont soit bien des surexprimeurs ou bien qu'il soit KO pour le gène d'intérêt. Le cas échéant, des lignées mutantes complétée par l'expression du gène seront produites pour vérifier que l'expression du gène fonctionnel complémente la déficience observée chez les mutants. Dans un futur proche, nous envisageons également de traiter les semences de mutants avec une méthode d'osmopriming en présence du peptide synthétique correspondant à la séquence cible de la mutation. La capacité de ces peptides à réduire la sévérité des symptômes observés chez les semences infectées de ces mutants renforcera l'hypothèse d'une implication de ces peptides les mécanismes de défense.

De plus, il serait intéressant, de tester la capacité germinative des différents mutants de ces gènes en absence d'*Alternaria brassicicola*. Si cette réduction du taux est la même que ce soit en présence ou non du pathogène, le phénotype de germination serait avéré chez le mutant de ces gènes. Nous pourrions également envisager d'adapter la méthode de quantification des nécroses sur jeunes plantules par analyse d'images pour notre propre expérimentation (Barrit *et al.*, 2022). Ceci permettrait de mesurer de manière façon plus précise l'effet du champignon sur la croissance et la sensibilité des différents mutants au stade plantule.

Ces différents résultats de la caractérisation de la sensibilité de mutants de peptide d'*Arabidopsis thaliana* constituent les prémisses d'investigations plus approfondies. La comparaison de l'implication des peptides entre le stade post germinatif et le stade rosette sera alors très intéressante à réaliser.

Les perspectives s'étendent au-delà du cadre du stage. En effet, les peptides dont les mutants seront confirmés comme présentant une sensibilité particulière feront l'objet d'un isolement in planta par le partenaire de l'Université Paul Sabatier (CNRS, Toulouse) et la plateforme de protéomique PAPSO du laboratoire de Génétique quantitative et Évolution (CNRS, Le Moulon). Ces peptides à la frontière des voies de défenses et du développement ouvrent des pistes vers de nouvelles stratégies d'amélioration variétales considérant conjointement ces deux aspects. Ce travail sera à terme source d'innovation pour des approches de biocontrôle.

6. Bibliographie

Albert M. 2013. Peptides as triggers of plant defence. *Journal of Experimental Botany* **64**, 5269–5279.

Alonso JM, Stepanova AN, Leisse TJ, et al. 2003. Genome-wide insertional mutagenesis of *Arabidopsis thaliana*. *Science (New York, N.Y.)* **301**, 653–657.

Barrit T, Campion C, Aligon S, Bourbeillon J, Rousseau D, Planchet E, Teulat B. 2022. A new in vitro monitoring system reveals a specific influence of *Arabidopsis* nitrogen nutrition on its susceptibility to *Alternaria brassicicola* at the seedling stage. *Plant Methods* **18**, 131.

Benhamou N, Rey P. 2012. Stimulateurs des défenses naturelles des plantes : une nouvelle stratégie phytosanitaire dans un contexte d'écoproduction durable. II. Intérêt des SDN en protection des cultures. *Phytoprotection* **92**, 24–35.

Berardini TZ, Reiser L, Li D, Mezheritsky Y, Muller R, Strait E, Huala E. 2015. The *Arabidopsis* information resource: Making and mining the 'gold standard' annotated reference plant genome. *Genesis (New York, N.Y.: 2000)* **53**, 474–485.

Boschiero C, Dai X, Lundquist PK, et al. 2020. MtSSPdb: The *Medicago truncatula* Small Secreted Peptide Database1 [OPEN]. *Plant Physiology* **183**, 399–413.

Buscaill P, Rivas S. 2014. Transcriptional control of plant defence responses. *Current Opinion in Plant Biology* **20**, 35–46.

De Coninck B, De Smet I. 2016. Plant peptides - taking them to the next level. *Journal of Experimental Botany* **67**, 4791–4795.

Gilbert GS, Diaz A, Bregoff HA. 2023. Seed Disinfestation Practices to Control Seed-Borne Fungi and Bacteria in Home Production of Sprouts. *Foods* **12**, 747.

Goyal RK, Mattoo AK. 2014. Multitasking antimicrobial peptides in plant development and host defense against biotic/abiotic stress. *Plant Science: An International Journal of Experimental Plant Biology* **228**, 135–149.

Guillemette T, Calmes B, Simoneau P. 2014. Impact of the UPR on the virulence of the plant fungal pathogen *A. brassicicola*. *Virulence* **5**, 357–364.

Guillou M-C. 2022. Caractérisation fonctionnelle de peptides sécrétés SCOOP impliqués dans le contrôle des voies de défense et du développement chez *Arabidopsis*.

Gust AA, Pruitt R, Nürnberger T. 2017. Sensing Danger: Key to Activating Plant Immunity. *Trends in Plant Science* **22**, 779–791.

Iacomini B, Blancard D, Guenard M, Molinero-Demilly V, Laurent E, Simoneau P. 2002. Development of a PCR-based diagnostic assay for detecting pathogenic *Alternaria* species in cruciferous seeds. *Seed Science and Technology* **30**, 87–95.

Joubert A. 2011. Adaptation d'*Alternaria brassicicola* à son hôte: Etude de composantes moléculaires impliquées dans la protection du champignon pathogène vis-à-vis des phytoalexines indoliques des Brassicaceae. , 203 p.

Lozano-Isla F, Benites-Alfaro OE, Pompelli MF. 2019. GerminaR: An R package for germination analysis with the interactive web application “GerminaQuant for R”. *Ecological Research* **34**, 339–346.

Marmioli N, Maestri E. 2014. Plant peptides in defense and signaling. *Peptides* **56**, 30–44.

Matsubayashi KW, Ohshima I, Nosil P. 2010. Ecological speciation in phytophagous insects. *Entomologia Experimentalis et Applicata* **134**, 1–27.

Murphy E, Smith S, De Smet I. 2012. Small Signaling Peptides in Arabidopsis Development: How Cells Communicate Over a Short Distance. *The Plant Cell* **24**, 3198–3217.

Ortega-Cuadros M, De Souza TL, Berruyer R, et al. 2022. Seed Transmission of Pathogens: Non-Canonical Immune Response in Arabidopsis Germinating Seeds Compared to Early Seedlings against the Necrotrophic Fungus *Alternaria brassicicola*. *Plants* **11**, 1708.

Pochon S, Terrasson E, Guillemette T, Iacomi-Vasilescu B, Georgeault S, Juchaux M, Berruyer R, Debeaujon I, Simoneau P, Campion C. 2012. The Arabidopsis thaliana-*Alternaria brassicicola* pathosystem: A model interaction for investigating seed transmission of necrotrophic fungi. *Plant Methods* **8**, 16.

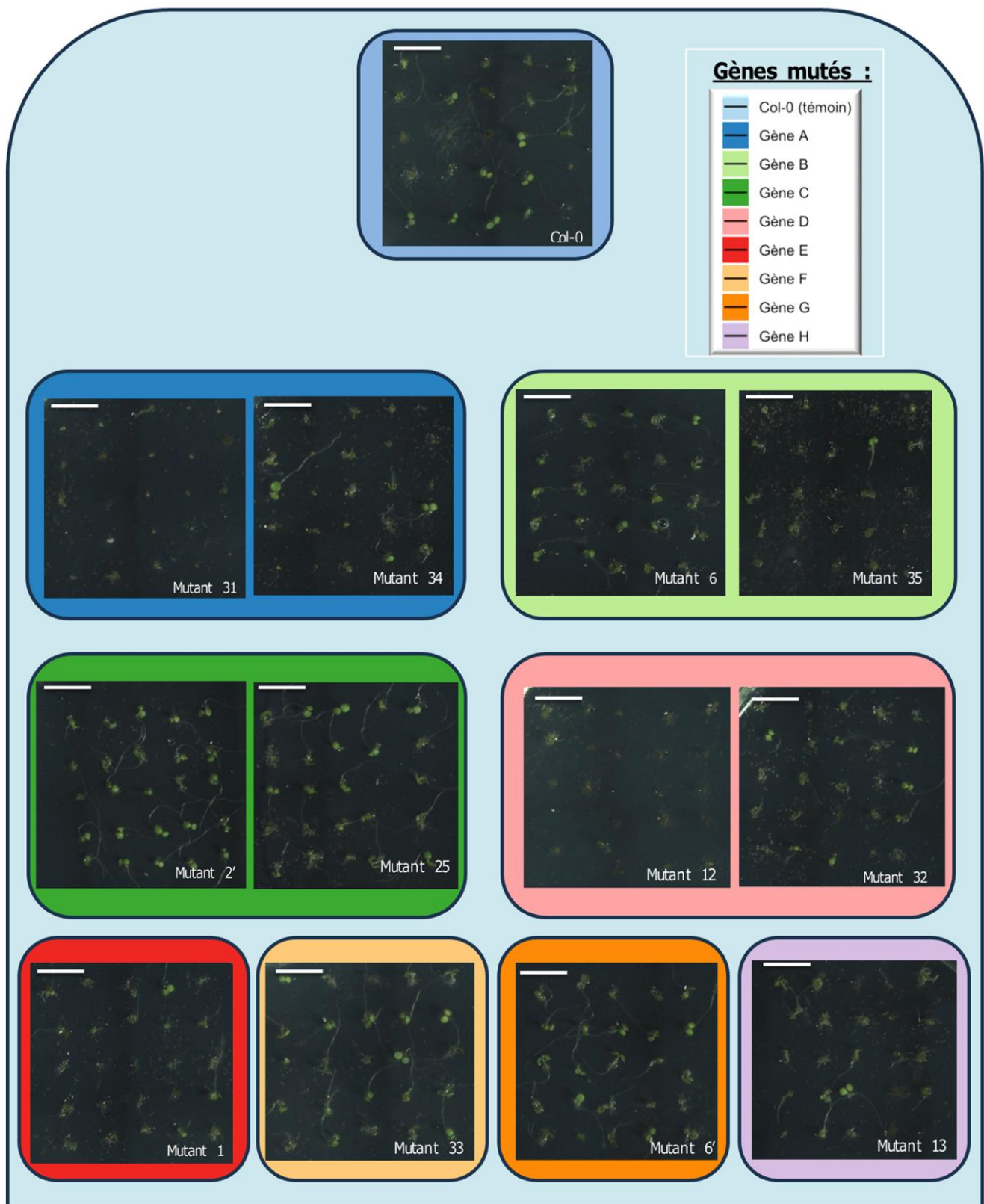
Savary S, Willocquet L, Pethybridge SJ, Esker P, McRoberts N, Nelson A. 2019. The global burden of pathogens and pests on major food crops. *Nature Ecology & Evolution* **3**, 430–439.

Silverstein RA, Chen Y, Sharma-Shivappa RR, Boyette MD, Osborne J. 2007. A comparison of chemical pretreatment methods for improving saccharification of cotton stalks. *Bioresource Technology* **98**, 3000–3011.

Tavormina P, De Coninck B, Nikonorova N, De Smet I, Cammue BPA. 2015. The Plant Peptidome: An Expanding Repertoire of Structural Features and Biological Functions. *The Plant Cell* **27**, 2095–2118.

Wickham H, Chang W, Henry L, et al. 2023. ggplot2: Create Elegant Data Visualisations Using the Grammar of Graphics.

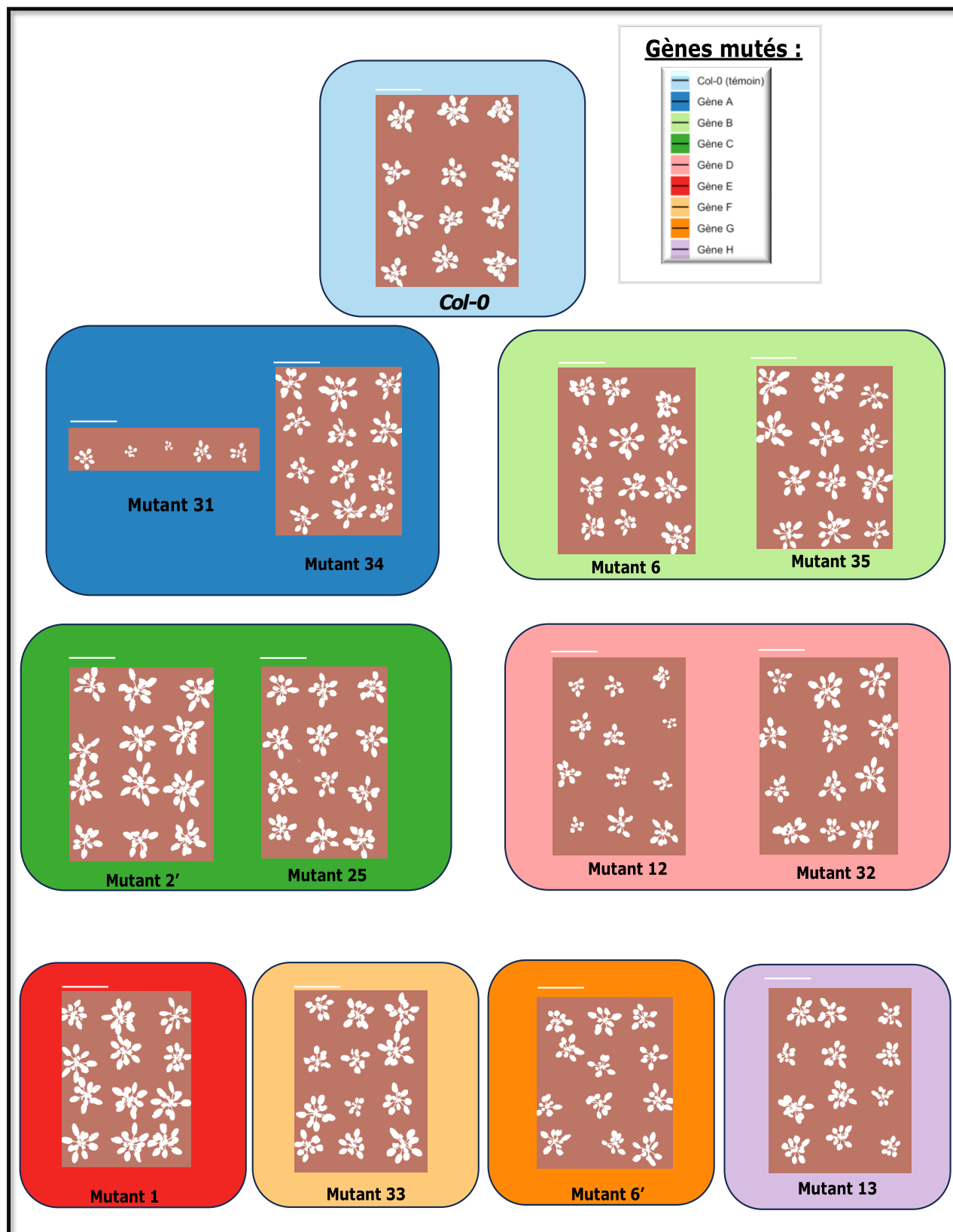
Annexes :



Annexe I: Comparaison des différents géotypes 7 jours après le semis sur gélose eau 0,8% des différents mutants de peptides sécrétés d'*Arabidopsis thaliana* inoculés avec *Alternaria brassicicola*

Sur chaque images la barre d'échelle équivaut à une distance de 0,5 cm

Le code couleur utilisé permet d'identifier le comportement des lignées mutantes d'un même gène



Annexe II : Comparaison visuelle des différents mutants de peptides sécrétés d'*Arabidopsis thaliana* 5 semaines après le semis (avant l'inoculation)

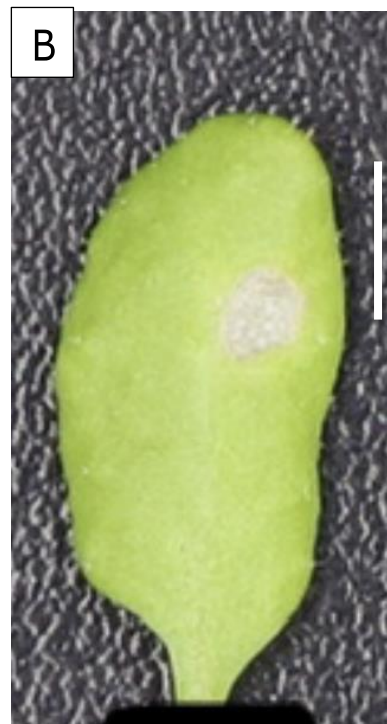
Les images sont issues de la segmentation réalisée sur le logiciel Ilastik et ont permis de déterminer la surface foliaire de chaque individu. Les surfaces foliaires apparaissent de couleurs blanches.

Sur chaque images la barre d'échelle équivaut à une distance de 9 cm.

Le code couleur utilisé permet d'identifier le comportement des lignées mutantes d'un même gène.



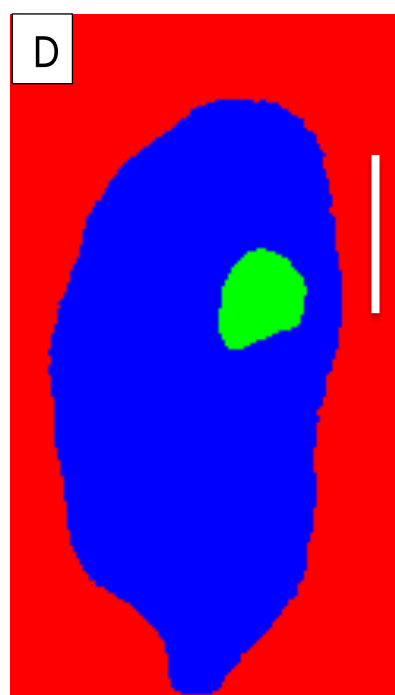
Col-0 non inoculé



Col-0 inoculé



Col-0 non inoculé



Col-0 inoculé

Annexe III: Visualisation des surfaces foliaires et des nécroses une semaine après inoculation ou non d'*Alternaria brassicicola* sur des feuilles d'*Arabidopsis thaliana* âgées de 5 semaines.

Les images A et B représentent les images acquises de feuille inoculé (A) ou non inoculé (B)
 Les images C et D sont celles obtenu par la segmentation sur Ilastik, Le fond est de couleurs rouges, les symptômes (nécroses) apparaissent en vert, et les parties saines apparaissent en bleu.
 Pour chaque image la barre d'échelle correspond à une distance réelle de 5 mm

RÉSUMÉ

Les plantes ont développé des mécanismes de régulation complexes et spécifiques pour favoriser leur développement, leur croissance et leur défense face aux agressions extérieures. Parmi eux, les phytoctokines sont de petits peptides de signalisation sécrétés, connus pour participer à la régulation de ces différents processus.

Dans le cadre du projet ANR STRESS-PEPT nous nous sommes focalisés sur l'identification et le rôle des peptides sécrétés par *Arabidopsis thaliana* dans son interaction avec le champignon nécrotrophe *Alternaria brassicicola*. L'étude s'est concentrée sur 12 mutants d'*Arabidopsis thaliana* affectés dans l'activité de 8 gènes codant pour des peptides sécrétés sélectionnés par analyse RNAseq. Le présent travail a permis de montrer qu'au stade post-germinatif, 7 des 8 gènes étudiés étaient impliqués dans la sensibilité de la plante à l'infection par *Alternaria brassicicola*. Certains de ces gènes étaient également liés à la capacité germinative. Au stade rosette, une méthode de quantification des symptômes et de la surface foliaire a été développée. Les résultats ont suggéré que les mutations de certains gènes affectaient la croissance de la plante. L'analyse des symptômes des nécroses est en cours pour comprendre l'implication des peptides dans l'interaction entre *A. thaliana* et *A. brassicicola*.

Les résultats obtenus fournissent des bases pour des recherches approfondies sur l'implication des peptides sécrétés à différents stades de développement. Ces peptides à la frontière des voies de défenses et du développement ouvrent des pistes vers de nouvelles stratégies d'amélioration variétales considérant conjointement ces deux aspects. Ce travail sera à terme source d'innovation pour des approches de biocontrôle.

mots-clés : peptides sécrétés, *Alternaria brassicicola*, *Arabidopsis thaliana*, génétique fonctionnelle, défense, croissance

ABSTRACT

Plants have developed complex and specific regulatory mechanisms to promote their development, growth, and defense against external threats. Among them, phytoctokines are small secreted signaling peptides known to participate in the regulation of these various processes. Within the framework of the ANR STRESS-PEPT project, we focused on the identification and role of peptides secreted by *Arabidopsis thaliana* in its interaction with the necrotrophic fungus *Alternaria brassicicola*. The study focused on 12 mutants of *Arabidopsis thaliana* affected in the activity of 8 genes encoding secreted peptides selected through RNAseq analysis. This work has shown that, at the post-germinative stage, 7 out of the 8 genes studied were involved in the plant's susceptibility to infection by *Alternaria brassicicola*. Some of these genes were also linked to germinative capacity. At the rosette stage, a method for quantifying symptoms and leaf area was developed. The results suggested that mutations in certain genes affected plant growth. Analysis of necrotic symptom is ongoing to understand the involvement of peptides in the interaction between *A. thaliana* and *A. brassicicola*. The obtained results provide a basis for in-depth research on the involvement of secreted peptides at different stages of development. These peptides, at the crossroads of defense pathways and development, open up avenues for new plant breeding strategies that consider both aspects simultaneously. Ultimately, this work will be a source of innovation for biocontrol approaches.

keywords : secreted peptides, *Alternaria brassicicola*, *Arabidopsis thaliana*, functional genetics, defense, growth

