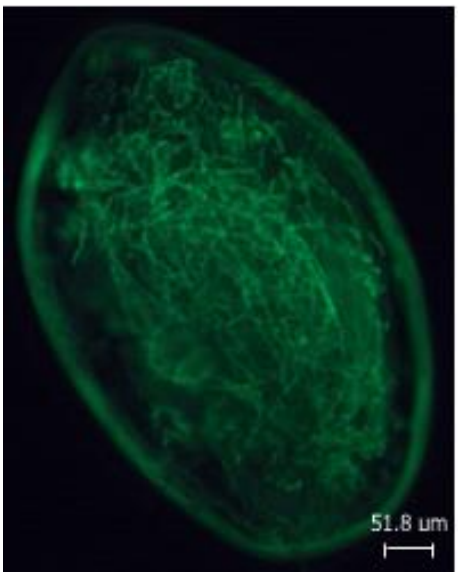
2016-2017

Mention Biologie et Technologie du Végétal



Mise au point de techniques de microscopie pour la visualisation de mycètes au niveau des semences

Claire ARCHER

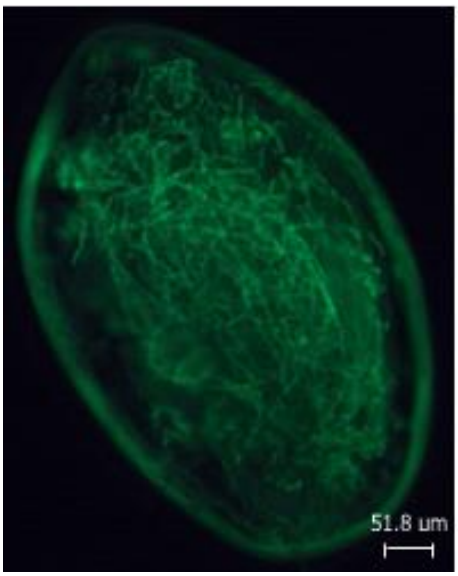
Sous la direction de
Thomas GUILLEMETTE (Pr.) et Elodie BELMAS (Doctorante)

Membres du jury
SIMIER Philippe| Responsable pédagogique du master 1 BTV - Président de jury
GUILLEMETTE Thomas | Maître de conférences - Maître de stage
MONTIEL Grégory | Maître de conférences - Tuteur
Fontaine Kévin | ATER - Auditeur

Soutenu publiquement le :
Mercredi 28 juin 2017

2016-2017

Mention Biologie et Technologie du Végétal



Mise au point de techniques de microscopie pour la visualisation de mycètes au niveau des semences

Claire ARCHER

Sous la direction de
Thomas GUILLEMETTE (Pr.) et Elodie BELMAS (Doctorante)

Membres du jury
SIMIER Philippe| Responsable pédagogique du master 1 BTV - Président de jury
GUILLEMETTE Thomas | Maître de conférences - Maître de stage
MONTIEL Grégory | Maître de conférences - Tuteur
Fontaine Kévin | ATER - Auditeur

Soutenu publiquement le :
Mercredi 28 juin 2017

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.

université angers

DUNE | Dépôt numérique des étudiants

AUTORISATION DE DIFFUSION EN LIGNE

http://dune.univ-angers.fr

PARTIE RESERVEE A L'ETUDIANT(E)

Courriel : claire.n.archer@chd.univ-angers.fr N° étudiant : 14003604

Je soussigné(e) *(nom prénom)* Archer Claire

certifie être l'auteur du document intitulé .....

.....

préparé sous la direction de M. Thomas Guillemette et Mme Cécile Belmon

et soutenu le 22 juin 2017

Je certifie la conformité de la version électronique déposée avec l'exemplaire imprimé remis au jury et certifie disposer de tous les droits sur les documents figurant dans mon mémoire ou, à défaut, disposer de toutes les autorisations nécessaires auprès des ayants droits. Agissant en l'absence de toute contrainte et sachant que je dispose à tout moment d'un droit de retrait de mes travaux :

☒ J'autorise la diffusion du document en texte intégral par l'Université d'Angers :

en accès : ☒ tout public ☐ réservé UA | à compter : ☒ de la date de soutenance ☐ du .....

☐ Je n'autorise pas la diffusion du document.

Le : 24/05/2017 À : Angers Signature :

PARTIE RESERVEE AU (A LA) MAITRE DE STAGE

Nom du (de la) maître de stage : Guillemette Thomas

☒ J'autorise la diffusion du document en texte intégral par l'Université d'Angers :

en accès : ☒ tout public ☐ réservé UA | à compter : ☒ de la date de soutenance ☐ du .....

☐ Je n'autorise pas la diffusion du document.

Le : 24/05/2017 À : Angers Signature :

PARTIE RESERVEE AU (A LA) PRESIDENT(E) DE JURY

Nom du (de la) président(e) de jury : .....

☐ J'autorise la diffusion du document en texte intégral par l'Université d'Angers :

☐ sans corrections ☐ avec corrections | en accès : ☐ tout public ☐ réservé UA | à compter : ☐ de la date de soutenance ☐ du .....

☐ Je n'autorise pas la diffusion du document.

Le : ..... À : ..... Signature :

REMERCIEMENTS

Je tiens tout d'abord à remercier Pascal Poupard et Philippe Simoneau, responsables de l'équipe FungiSem de m'avoir permis d'effectuer mon stage de Master 1 dans leur équipe de recherche.

Je tiens également à remercier Elodie Belmas mon encadrante, un grand merci à toi pour ton encadrement, tes conseils, ta patience. Merci de m'avoir proposé de venir t'aider pour ta thèse, ce fut un réel plaisir de travailler avec toi pendant ces 2 mois. Je te souhaite la réussite pour la thèse et pour la suite de ton parcours et on n'oublie pas « le positif attire le positif ! ».

Un grand merci aussi à Thomas Guillemette mon maître de stage, pour sa disponibilité malgré un emploi du temps très chargé, ses conseils et son accompagnement lors de la rédaction de ce rapport de stage.

Je souhaite également remercier Fabienne Simonneau et Aurélia Rolland du plateau IMAC pour les formations à la technique de coupe au cryostat, aux colorations. Merci pour votre aide, vos conseils et votre persévérance.

Un grand merci également à Bruno Hamon avec qui j'ai partagé le bureau, merci de toujours trouver une solution à tout. Merci également à Sophie Aligon pour l'aide apportée et les conseils.

Merci aussi à Claire Campion pour la relecture du rapport, Franck Bastide, Anthony Kwasiborski, Muriel Marchi, Kévin Fontaine et l'ensemble de l'équipe FungiSem.

Un grand merci aussi à Justine et Julia les doctorantes de l'équipe pour leur soutien, leurs conseils et leur bonne humeur. Bon courage pour la thèse et pour la suite. Merci également à tous les stagiaires présents : Corentin, Hugo, Baptiste, Adrien…

ENGAGEMENT DE NON PLAGIAT

Je, soussigné(e) Claire ARCHER
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.

signé par l'étudiant(e) le **20** / **06** / **2017**

Cet engagement de non plagiat doit être signé et joint à tous les rapports, dossiers, mémoires.

Présidence de l'université
40 rue de rennes – BP 73532
49035 Angers cedex
Tél. 02 41 96 23 23 | Fax 02 41 96 23 00

université angers

Glossaire

Albumen : tissu de réserves nutritives placé sous les téguments dans la graine

Champignon phytopathogène : type de champignon parasite de plantes à l'origine des maladies cryptogamiques

Conidie : spore assurant la reproduction asexuée des champignons

Cryostat : instrument permettant d'obtenir des températures cryogéniques (jusqu'à -40°C) permettant la réalisation de coupes histologiques dans un gel

Hile : cicatrice portée par la graine là où elle était attachée à la plante

Imbibition : absorption de l'eau par la graine qui détermine le début de la germination au sens strict (Bewley, 1997 ; Bove *et al.*, 2002)

Organisme nécrotrophe : organisme capable d'infecter les tissus vivants et de tuer les cellules hôtes notamment grâce à l'action de toxines. Ces organismes colonisent ensuite les tissus morts.

Saprophyte : organismes capable de se nourrir de matière organique morte, le plus souvent en décomposition

Silique : fruit sec déhiscent contenant les graines notamment pour *A. thaliana*

Solophényl : colorant permettant de mettre en évidence les hyphes fongiques (Hoch *et al.*, 2005)

Téguments : tissus formant une enveloppe protectrice autour des divers organes de la graine (notamment l'albumen et l'embryon)

Liste des abréviations

IMAC : Plateau Technique « Imagerie Cellulaire »

INEM : Installations Expérimentales Mutualisées

IRHS : Institut de Recherche en Horticulture et Semences

INRA : Institut National de la Recherche Agronomique

PDA : Potato Dextrose Agar

SCIAM : Service Commun d'Imageries et d'Analyses Microscopiques

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

UMR : Unité Mixte de Recherche

WT : Wild-Type, souche sauvage

Liste des unités internationales

L, mL, µL : litre, millilitre, microlitre

M, mM, µM : molaire, millimolaire, micromolaire

m, cm, mm, µm : mètre, centimètre, millimètre, micromètre

g, mg, µg : gramme, milligramme, microgramme

°C : degré Celsius

h, mn, s : heure, minute, seconde

Table des matières

TABLE DES FIGURES 1

TABLE DES TABLEAUX 1

MISE AU POINT DE TECHNIQUES DE MICROSCOPIE POUR LA VISUALISATION DE MYCETES AU NIVEAU DES SEMENCES 1

1. Introduction 1
1.1. Présentation de la structure d'accueil 1
2. Synthèse bibliographique 2
2.1. Alternaria brassicicola, agent du black spot des Brassicacées 2
2.2. Le pathosystème Alternaria brassicicola / Brassicacées 3
2.3. La transmission à et par les semences 3
2.4. Les travaux antérieurs sur la localisation du champignon dans les tissus de la graine 4
2.5. Les objectifs du stage 5
3. Matériel et Méthodes 6
3.1. Matériel végétal et microbiologique et inoculum 6
3.2. Inoculation sur plantes 6
3.3. Préparation des graines contaminées 7
3.4. Suivi de l'évolution de la maladie 8
3.5. Localisation du champignon dans les tissus de la graine et de la plantule 8
4. Résultats 10
4.1. Développement de la maladie 10
4.2. Vérification de la pathogénicité des souches fongiques 11
4.3. Observation de graines entières en microscopie à fluorescence 12
4.4. Mise au point de coupes de graines au cryostat 12
4.5. Observations des coupes en microscopie confocale à balayage laser 13
5. Discussion 14
6. Conclusions et perspectives 17
7. Bibliographie 18
7.1. Ouvrages et articles de revues scientifiques 18
7.2. Sources internet 19

Table des figures

Figure 1 : Organisation de l'IRHS -- 3 pôles et les 15 équipes [1]

Figure 2 : Forme de reproduction asexuée d'Alternaria brassicicola : conidies (A) et chaîne de conidies (B) [4]

Figure 3 : Symptômes causés par A. brassicicola sur une feuille de chou - CA

Figure 4 : Cycle de dissémination et de contamination d'Alternaria brassicicola agent du black spot

Figure 5 : Coupe d'une graine d'Arabidopsis thaliana dans une silique colorée au bleu de Toluidine. Echelle = 20µm (d'après WINDSOR et al., 2000)

Figure 6 : Les différentes voies de transmission des agents phytopathogènes aux semences (d'après MAUDE, 1996)

Figure 7 : Localisation d'A. brassicicola sur des graines d'A. thaliana en microscopie électronique à balayage (Photos SCIAM - d'après POCHON et al., 2012)

Figure 8 : Développement du mycélium d'A. brassicicola sur une graine d'A. thaliana observée en microscopie confocale, hyphes colorés avec du solophényl et enveloppe de la graine à l'iodure de propidium. Les pointes de flèches correspondent aux points de pénétration des hyphes dans les téguments. (Photo IMAC - POCHON et al., 2012)

Figure 9 : Aspect des graines d'A. thaliana saines (f) ou contaminées par A. brassicicola (e) en microscopie électronique à balayage (d'après POCHON et al., 2012)

Figure 10 : Stade de développement d'Arabidopsis thaliana de la graine sèche au stade plantule (E. Belmas).

Figure 11 : Schéma représentatif de l'inoculation des feuilles de chou (Brassica oleracea) en conidies/mL

Figure 12 : Plant d'A. thaliana de l'écotype Col 0 inoculé par dépôt de conidies sur 2 feuilles de la rosette - CA

Figure 13 : Organisation d'une mini-serre pour l'inoculation sur rosette d'A. thaliana - CA

Figure 14 : Schéma représentatif de l'inoculation des siliques d'Arabidopsis thaliana (d'après Pochon, 2012)

Figure 15 : Spectres d'absorption du fluorophore utilisé pour la microscopie confocale (solophényl) (Hoch et al., 2005)

Figure 16 : Eléments du cryostat pour l'obtention des coupes de graines et de plantules - CA

Figure 17 : Suivi du développement de la maladie induite par Abra 43WT sur graine et plantule d'A. thaliana

Figure 18 : Observation des symptômes sur feuilles de chou 8 jours après inoculation par dépôt de conidies des souches Abra43 WT et A. alternata 42 calibrées à 10^5, 10^4 et 10^3 conidies/mL

Figure 19 : Observation des symptômes sur rosette d'A. thaliana 7 jours après inoculation par dépôt de conidies des souches Abra43 WT et A. alternata 42 calibrées à 10^5, 10^4 et 10^3 conidies/mL.

Figure 20 : Mesure de la taille des nécroses (mesurée manuellement) sur feuilles d'A. thaliana de l'écotype Ler 7 jours après une inoculation par les souches Abra43, Aa42 et eau à des concentrations de 10^5, 10^4 et 10^3 conidies/mL (moyenne ± écart types et lettres de significativité A et B correspondent aux différents groupes homogènes déterminés grâce au test de Kruskal-Wallis combinée à la comparaison multiple de Tukey)

Figure 21 : Illustrations de graines entières artificiellement contaminées, colorées au solophényl et observées au microscope en fluorescence avec un filtre GFP-FITC et correspondance en lumière blanche.

Figure 22 : Coupes de graines (6h) réalisées au cryostat (IMAC) disposées sur une lame porte-objet). Lame prête pour la coloration en vue de l'observation en microscopie confocale

Figure 23 : Illustrations de coupes de graines (10µm) non contaminées à 0h observées au microscope au grossissement x10 (photos IMAC)

Figure 24 : Illustrations de coupes de graines (7µm) contaminées par Abra43 WT à 0h observées au microscope au grossissement x20 (photos IMAC) La flèche rouge indique la présence du champignon

Figure 25 : Illustrations de coupes de plantule à 80h (10µm) contaminées par Abra43 WT observées au microscope au grossissement x20 (photos IMAC)

Figure 26 : Localisation d'A. brassicicola sur des graines d'A. thaliana pendant la germination, au stade de graine sèche (a) au stade d'imbibition de la graine (b) Les flèches montrent le champignon. (E. Belmas)

Table des tableaux

Tableau I : Stades physiologiques clés au cours de la transition entre le stade de graine au stade de plantule

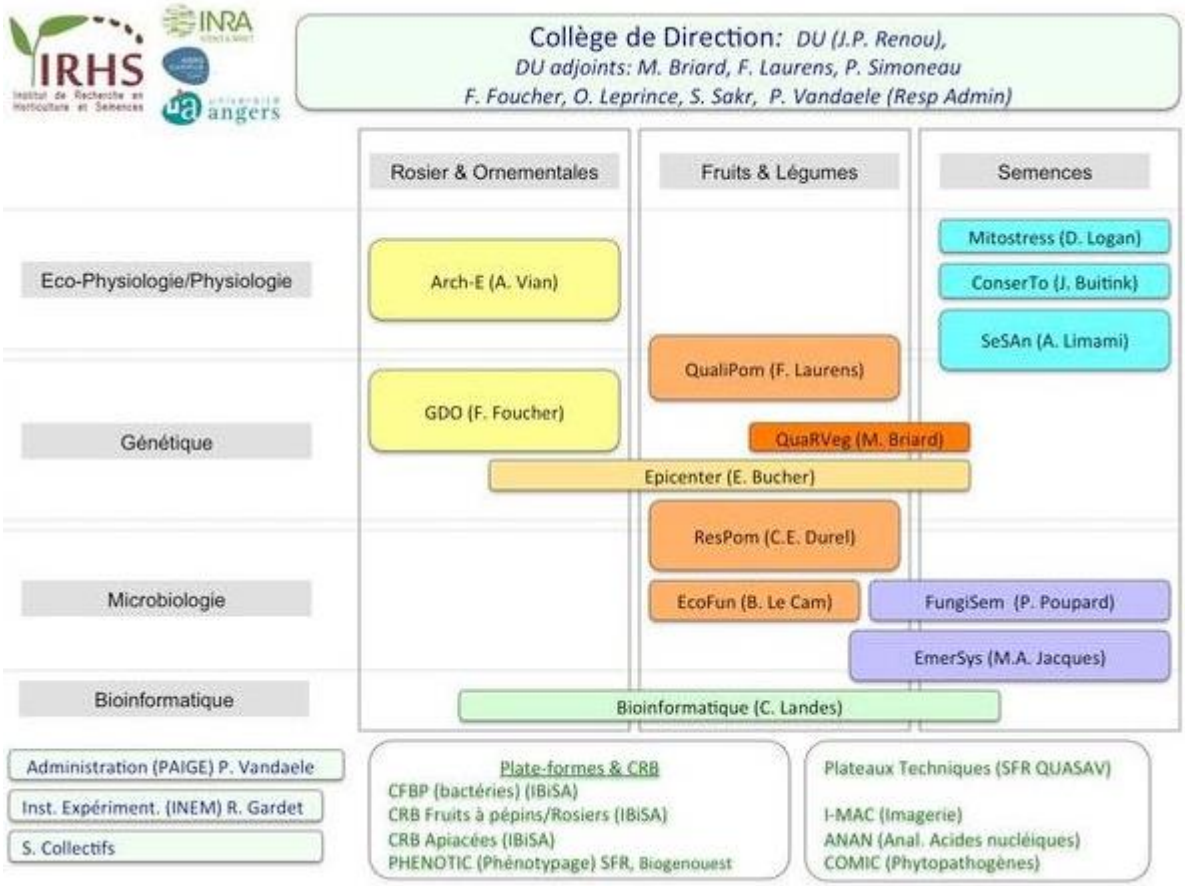


Figure 1 : Organisation de l'IRHS -- 3 pôles et les 15 équipes [1]

Mise au point de techniques de microscopie pour la visualisation de mycètes au niveau des semences

1. Introduction

1.1. Présentation de la structure d'accueil

1.1.1. Présentation de l'IRHS

L'IRHS (Institut de Recherche en Horticulture et Semences) est une Unité Mixte de Recherche (UMR n°1345) qui regroupe depuis le 1er janvier 2012 des acteurs de la recherche dans le domaine végétal sous les tutelles de l'INRA (Institut National de la Recherche Agronomique), d'Agrocampus-Ouest et de l'Université d'Angers. Situé au cœur du pôle végétal français, cet institut de recherche compte aujourd'hui 230 chercheurs, enseignants-chercheurs, ingénieurs, techniciens et doctorants répartis dans 15 équipes. Les recherches de l'IRHS concernent la qualité et la santé du végétal ''spécialisé'', autour de trois pôles (Figure 1 – [2]) :

- le pôle « **Rosier et autres ornementales** », qui regroupe des thématiques sur l'architecture et la floraison des plantes d'ornement.
- le pôle « **Qualité et santé des fruits et légumes** », qui regroupe les travaux de recherche sur les Pomoïdées fruitières, Apiacées, et sur les bioagresseurs associés.
- le pôle « **Semences, stress et pathogènes** », qui regroupe les études menées sur la qualité physiologique et sanitaire des semences. C'est au sein de ce dernier pôle que s'inscrit le stage réalisé au sein de l'équipe FungiSem.

L'IRHS bénéficie de la proximité de la structure fédérative de recherche QUASAV (« Qualité et Santé du Végétal ») créée en 2008 dans un but d'animation scientifique et de dynamisation de la recherche. La SFR participe notamment à la mutualisation des moyens techniques sur des plateaux et des plateformes. Cette mutualisation des moyens matériels et humains permet d'optimiser l'avancement des recherches en coordonnant les connaissances (génétique, bioinformatique, phytopathologie…) [3].

1.1.2. Présentation de l'équipe FungiSem

L'équipe FungiSem étudie les déterminants du pouvoir pathogène des agents fongiques lors de l'interaction plante-pathogène ainsi que les réponses adaptatives en cas de stress abiotiques divers pouvant être rencontrés lors de leur cycle de développement. Leurs travaux de recherche ont conduit à l'analyse des réponses de ces champignons face aux mécanismes de défense mis en place par les plantes et à l'étude de la transmission de l'agent pathogène à et par les semences.

Cette équipe se focalise sur l'étude des champignons du genre *Alternaria* pathogènes des Brassicacées et des Apiacées. Les études concernent en partie l'adaptation d'*Alternaria brassicicola* sur les Brassicacées notamment en utilisant la plante modèle, *Arabidopsis thaliana* ou une plante d'intérêt économique, le chou.

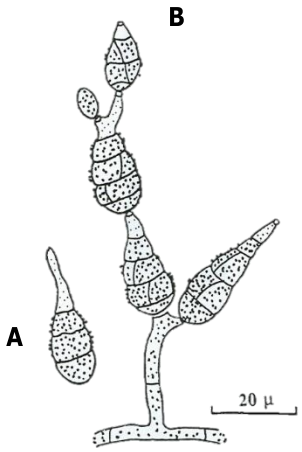


Figure 2 : Forme de reproduction asexuée d'Alternaria brassicicola : conidies (A) et chaîne de conidies (B) [4]

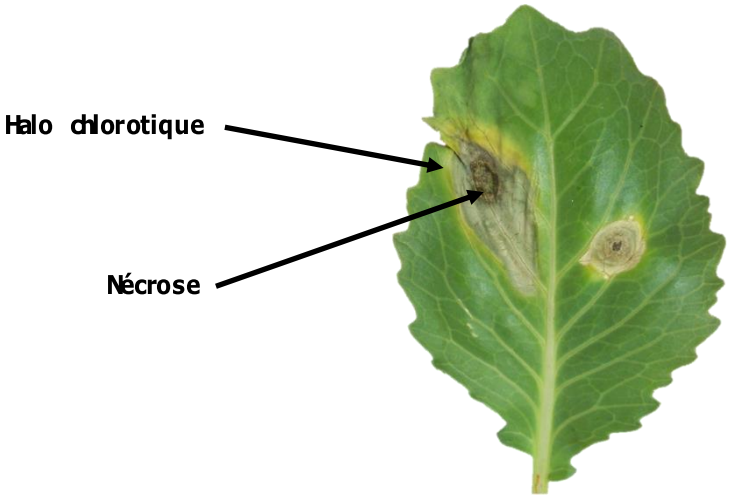


Figure 3 : Symptômes causés par A. brassicicola sur une feuille de chou - CA

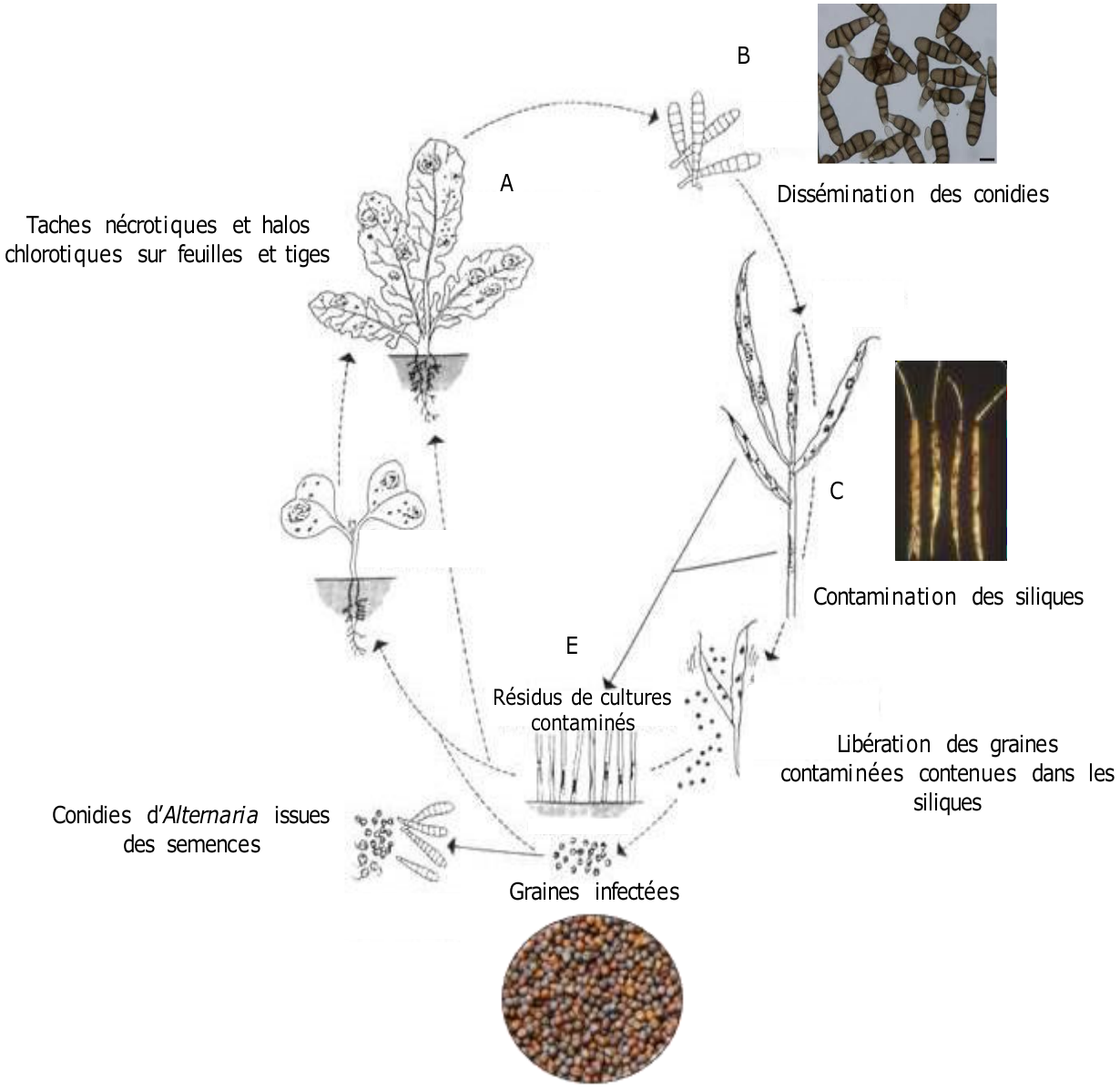


Figure 4 : Cycle de dissémination et de contamination d'Alternaria brassicicola agent du black spot (d'après Guillemette, 2003*)*

2. Synthèse bibliographique

L'étude des interactions plante-pathogène nécessite d'évaluer précisément l'impact du pathogène sur la plante hôte. Les semences sont une source majeure d'inoculum provoquant des maladies causant des pertes économiques importantes. Dans un contexte environnemental où l'on doit limiter l'utilisation d'intrants chimiques, la connaissance des déterminants de l'hôte et du pathogène potentiellement impliqués dans la pathogénicité est primordiale (Belmas, communication personnelle).

2.1. *Alternaria brassicicola*, agent du black spot des Brassicacées

Le genre *Alternaria* regroupe un grand nombre d'espèces fongiques majoritairement saprophytes*, c'est-à-dire que ces champignons sont présents sur les semences mais ne perturbent généralement par le développement des jeunes plantes, c'est le cas d'*A. alternata* qui est utilisé en recherche pour comparer une souche saprophyte à une souche pathogène. Cependant certaines espèces sont pathogènes, c'est-à-dire qu'elles se développent aux dépens de leur hôte, c'est le cas d'*A. brassicicola* qui appartient à la famille des Ascomycètes et à la classe des Dothidéomycètes. Il s'agit d'un champignon phytopathogène* spécifique des Brassicacées, du fait de son spectre d'hôte restreint (Guillemette *et al.*, 2014). Les Brassicacées sont des plantes Dicotylédones vivaces, annuelles ou bisannuelles. Une grande partie des Brassicacées cultivées, qui sont la cible d'*A. brassicicola*, sont destinées à la consommation humaine (radis, colza, navet, chou, moutarde) (Joubert, 2011). La contamination par les semences par *A. brassicicola* implique des pertes économiques au moment de leur commercialisation, pouvant aller jusqu'à 80% (Pochon *et al.*, 2012), mais également au champs avec des diminutions de rendement jusqu'à 80% sur des parcelles de chou-fleur (Maude and Humpherson-Jones, 1980).

A. brassicicola ne présente pas de forme de reproduction sexuée connue, mais se multiplie par voie asexuée, par génération de conidies*, qui peuvent être multicellulaires, piriformes (en forme de massue) ou ovoïdes, et sont généralement cloisonnées transversalement ou longitudinalement. Elles sont, soit solitaires, soit associées en chaînettes (Figure 2 – (Thomma, 2003). *A. brassicicola* forme avec *A. brassicae* et *A. japonica* un complexe de trois espèces causant la maladie des « taches noires », aussi appelée « black spot » (Figure 3 - Iacomi-Vasilescu *et al.*, 2002).

Le cycle de développement de ce champignon nécrotrophe* comprend différentes périodes caractéristiques : une période de contamination correspondant à l'infection primaire, une période d'expansion de la maladie grâce à la production d'un inoculum secondaire et une période de conservation quand les conditions deviennent défavorables au développement (N'Guyen, 2016).

Le « black spot » se caractérise par des nécroses foliaires entourées par un halo chlorotique (Figure 3) ce qui conduit à une diminution du potentiel photosynthétique de ces organes (Figure 4 A). Des conidies sont produites à partir de ces nécroses et sont disséminées dans l'environnement, pouvant contaminer tous les organes végétatifs (figure 4 B) : cotylédons, tiges, feuilles ce qui constitue une réserve d'inoculum pouvant infecter ensuite les fleurs et les siliques* (Thomma, 2003 ; Calmes, 2011 – Figure 4 C et D). *A. brassicicola* peut ainsi inhiber la germination des semences (manques à la levée) ou provoquer des fontes de semis (Figure 4 E et F).

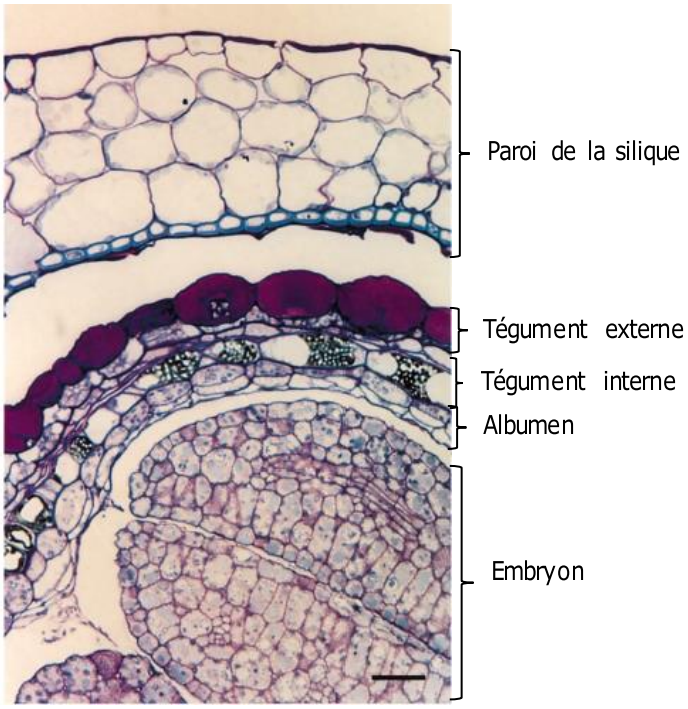


Figure 5 : Coupe d'une graine d'Arabidopsis thaliana dans une silique colorée au bleu de Toluidine. Echelle = 20µm (d'après WINDSOR et al., 2000*)*

La contamination des graines a lieu peu après la floraison et peut conduire à une ouverture prématurée des siliques, une diminution de la taille et à une altération de la vigueur et de la viabilité des graines (Maude and Humpherson-Jones, 1980 ; Kohl *et al.*, 2010). Des études ont montré qu'*Alternaria* peut se maintenir soit sous forme mycélienne soit sous forme de conidies au niveau des semences mais également dans les débris végétaux (notamment dans les résidus de culture contaminés – Figure 4 E) qui constituent la principale source d'inoculum avec les graines infectées.

Suite à une contamination externe de la semence, il est estimé que les tissus sont potentiellement infectieux pendant une durée de deux années. Cette période infectieuse s'entend à 12 ans lorsque la contamination est interne (Maude and Humpherson-Jones, 1980). En l'absence de variétés commerciales résistantes, la principale méthode de lutte contre la maladie, outre la lutte chimique en cours de végétation, est l'analyse sanitaire des lots de semences complétée par des traitements des lots de semences à l'eau chaude ou avec des fongicides (Pochon, 2012).

2.2. Le pathosystème *Alternaria brassicicola* / Brassicacées

Le pathosystème *A. brassicicola* / Brassicacées constitue l'un des modèles d'étude de l'équipe FungiSem dans laquelle mon stage a été effectué.

Arabidopsis thaliana, une plante herbacée annuelle devenue plante modèle et appartenant à la famille des Brassicacées, est également un hôte d'*A. brassicicola*. Elle constitue un outil de choix pour la compréhension des interactions dans le cadre du pathosystème *A. brassicicola* / Brassicacées qui est un modèle pour l'étude des interactions de type nécrotrophe (Lawrence *et al.*, 2008 ; Mukherjee *et al.*, 2009 ; Schenk *et al.*, 2003), notamment grâce à sa petite taille, son cycle de développement court et l'existence de collections d'écotypes et de mutants (McKhann *et al.*, 2004 ; Pochon, 2012). Cette plante modèle peut être facilement cultivée en enceinte climatique, permettant de contrôler les conditions de cultures et donc d'avoir une bonne reproductivité des résultats d'infection de graines (Agarwal and Sinclair, 1996). L'écotype Ler (Landsberg *erecta*) a été en particulier utilisé car il présente une sensibilité importante à *A. brassicicola*, contrairement à l'écotype Columbia plus souvent utilisé par les chercheurs (Otani *et al.*, 2001).

2.3. La transmission à et par les semences

Les semences constituent le principal vecteur pour la reproduction des végétaux, il s'agit donc d'un stade de développement critique (Figure 5). Afin de maintenir une bonne capacité de germination, une graine possède de nombreux systèmes de protection. Elle est notamment constituée d'une enveloppe entourant l'embryon ainsi que les réserves nutritives. Cette enveloppe se différencie en plusieurs couches de cellules spécialisées que sont le tégument* et l'albumen* (Figure 5). Les graines d'*A. thaliana* sont elles-mêmes protégées dans une silique (Figure 5). Pour bien comprendre le développement d'une maladie, il est important d'étudier la transmission de l'agent pathogène à la semence et notamment d'être capable de visualiser sa localisation dans les tissus.

La transmission à la semence, ou transmission verticale (d'une génération à l'autre) est une étape cruciale du cycle de développement d'*A. brassicicola*, en effet, elle permet d'assurer sa survie lorsque les conditions ne sont pas favorables. Il a été montré qu'au moment de l'infection, le stade de développement de la plante hôte peut influencer la localisation finale du champignon dans les tissus mais également l'étendue des dégâts sur les graines.

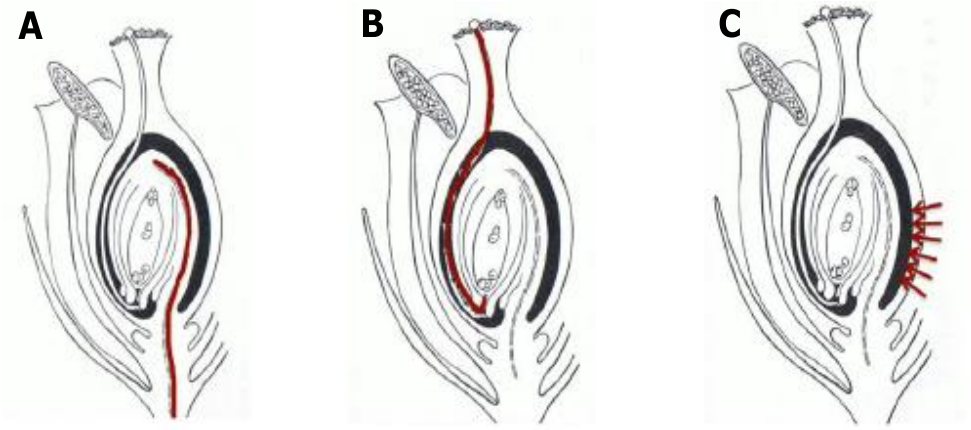


Figure 6 : Les différentes voies de transmission des agents phytopathogènes aux semences (d'après MAUDE, 1996)
A *Transmission via le xylème de la plante mère (voie vasculaire)*
B *Transmission via le stigmate et le style jusqu'à l'embryon (voie florale)*
C *Transmission par pénétration des tissus externes de l'ovule (par le fruit)*

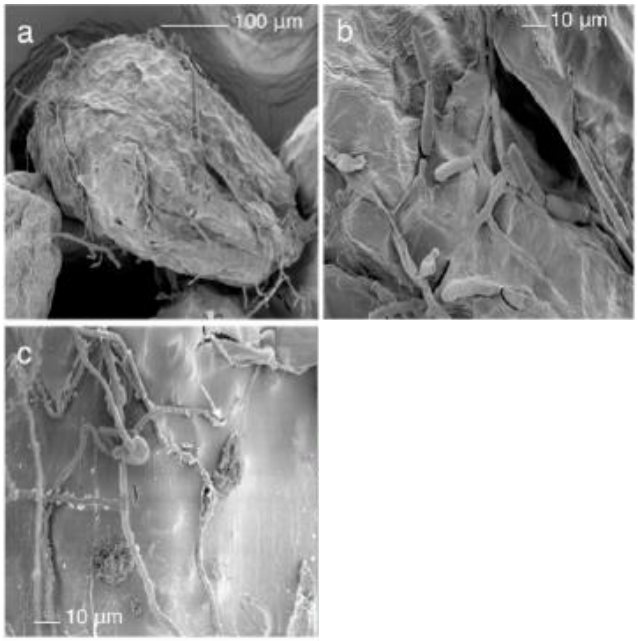


Figure 7 : Localisation d'A. brassicicola sur des graines d'A. thaliana en microscopie électronique à balayage (Photos SCIAM - d'après POCHON et al.*, 2012)*
a *Colonisation globale d'une graine*
b *Formation de conidies sur une graine*
c *Pénétration du mycélium dans les tissus de l'enveloppe de la graine*

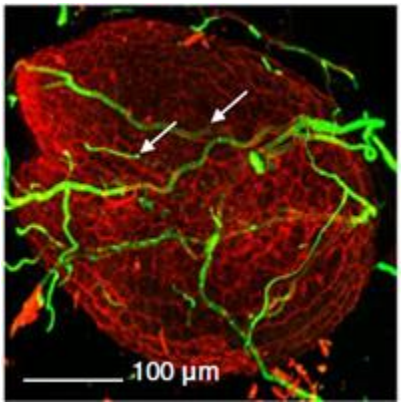


Figure 8 : Développement du mycélium d'A. brassicicola sur une graine d'A. thaliana observée en microscopie confocale, hyphes colorés avec du solophényl et enveloppe de la graine à l'iodure de propidium. Les pointes de flèches correspondent aux points de pénétration des hyphes dans les téguments. (Photo IMAC - POCHON et al.*, 2012)*

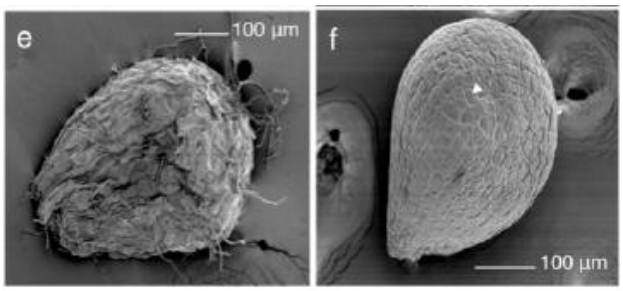


Figure 9 : Aspect des graines d'A. thaliana saines (f) ou contaminées par A. brassicicola (e) en microscopie électronique à balayage (d'après POCHON et al., 2012)

Des études ont permis de montrer que la voie privilégiée permettant le contact entre *A. brassicicola* et les graines *d'A. thaliana* passe par la contamination initiale des siliques. La dynamique de contamination des graines par *A. brassicicola* a ensuite été étudiée : le champignon est capable d'infecter la semence et de pénétrer dans les téguments, directement ou par des craquelures (Figure 7c). Il peut se développer abondamment sur les graines (Figures 7a et 8), et produire des conidies (Figure 7b) (Knox-Davies, 1979). Les conidies sont préférentiellement localisées dans les plis et les fissures des graines (Figure 7b) (Kohl and Van Der Wolf, 2005). Il a par ailleurs été montré que les graines infectées par *A. brassicicola* sont déformées par rapport à l'aspect d'une graine prélevée sur une plante témoin (Figure 9). Or, l'utilisation d'outils permettant d'étudier le mode de colonisation des tissus internes de la graine par ce champignon est encore limitée (Maude and Humpherson-Jones, 1980 ; Pochon *et al.*, 2012).

Trois voies principales de transmission de l'agent pathogène aux semences ont pu être identifiées, par colonisation des pièces florales et/ou du fruit ou par l'intermédiaire du système vasculaire (Figure 9 - Maude, 1996).

Des points d'entrée du champignon dans les graines interviennent, soit directement au niveau de l'enveloppe de la semence soit au niveau des fissures apparaissant pendant la maturation de la graine (Singh and Mathur, 2004 ; Wolf *et al.*, 1981). C'est pendant cette étape que l'infection interne des tissus semble avoir lieu (Agarwal and Sinclair, 1996 ; Kohl *et al.*, 2010). Les tubes germinatifs peuvent pénétrer dans les tissus mécaniquement, avec la participation d'enzymes ou encore *via* la formation d'appressoria (Singh and Mathur, 2004).

Des études antérieures ont permis d'amorcer le travail sur la localisation et le parcours d'entrée *d'A. brassicicola* dans les siliques puis dans les graines d'*A. thaliana* (Pochon *et al.*, 2012). Le mode d'infection est étudié notamment par microscopie électronique à balayage et microscopie confocale à balayage laser.

Les méthodes classiques d'analyse de la qualité sanitaire des semences permettent de détecter la présence d'un agent pathogène sur une semence mais ne permettent pas de quantifier les dégâts causés ni de localiser l'agent pathogène dans les tissus. Les techniques basées sur la microscopie (électronique ou confocale) sont destructives et présentent des limites pour l'observation des agents pathogènes à l'intérieur des semences (Pochon *et al.*, 2012).

Il a été montré qu'avec *A.brassicicola*, l'infection se limite à l'enveloppe de la graine et ne peut coloniser les cotylédons qu'en présence d'un inoculum très important (Kohl and Van Der Wolf, 2005). Après infection, les conidies et le mycélium peuvent être localisés dans les fissures de l'enveloppe de la graine et préférentiellement au niveau du hile* qui constitue un très bon abri pour l'inoculum fongique de par la présence de cavités et de pliures (Kohl and Van Der Wolf, 2005 ; Maude, 1996). Le développement d'un mycélium est observé uniquement sur le replum, ce qui suggère qu'*A. brassicicola* peut infecter les graines *via* le funicule et le hile (Bonman and Gabrielson, 1981).

2.4. Les travaux antérieurs sur la localisation du champignon dans les tissus de la graine

Les travaux antérieurs réalisés dans l'équipe FungiSem étaient focalisés sur la graine sèche. C'est au niveau du passage de l'état de semence à l'état de jeune plantule que se focalise maintenant la thèse d'E. Belmas, dont les objectifs concernent les mécanismes de défense de la plante qui contrôlent la transmission

Tableau I : Stades physiologiques clés au cours de la transition entre le stade de graine au stade de plantule

Temps physiologique	
0 heure	**Graine sèche**
6 heures après semis	**Imbibition** de la graine
54 heures après semis	Emergence de la radicule
80 heures après semis	Apparition des cotylédons, stade **plantule**

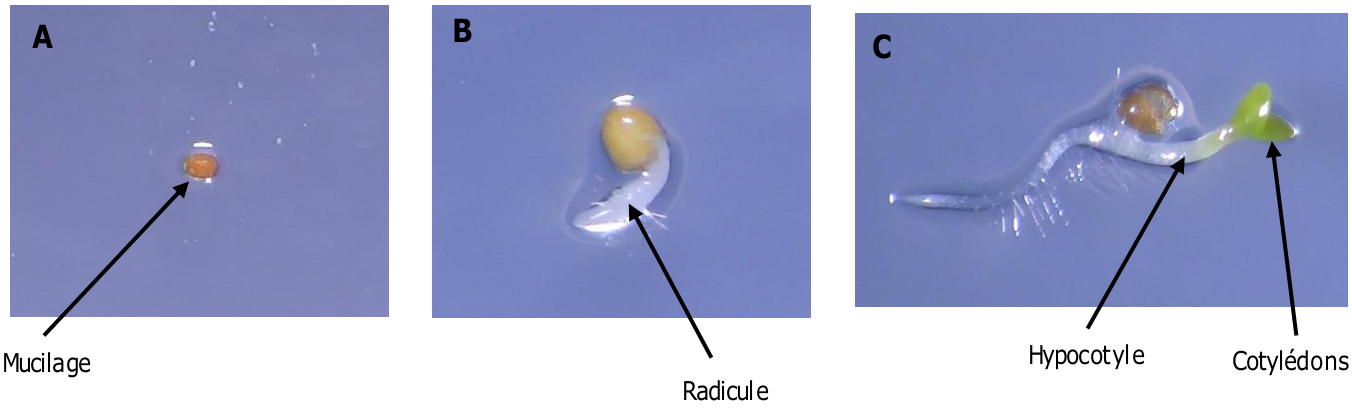


Figure 10 : Stade de développement d'Arabidopsis thaliana de la graine sèche au stade plantule (E. Belmas).
A *graine sèche,* **B** *émergence de la radicule* **C** *apparition des cotylédons (stade plantule)*

d'*A. brassicicola* lors de cette transition physiologique. A terme cela pourrait permettre de mettre en place de nouveaux moyens de lutte fongique.

Le travail porte ainsi sur les graines en cours de germination jusqu'au stade de jeune plantule. Afin d'identifier des stades de développement de la plante intéressants pour les observations microscopiques, une cinétique de germination a été réalisée avant mon arrivée, en utilisant les bancs de germination de la plateforme Phenosem (SFR QUASAV). Grâce à ce suivi automatisé de la germination, il a été possible de suivre le développement de la graine jusqu'au stade plantule et de caractériser les stades physiologiques clés pendant cette phase. Pour cela des images ont été prises toutes les 2h à l'aide de caméras et la séquence d'image a ensuite été analysée.

4 stades ont été identifiés, importants pour le développement de la plante et du champignon. Ce sont ces 4 points de mesure qui seront étudiés plus en détail dans le cadre de mon stage (Tableau I) :

- Graine sèche : 0h (Figure 10 A)
- Imbibition* de la graine : 6h (juste avant que le champignon commence à se développer sur le milieu)
- Emergence de la radicule : 54h (Figure 10 B)
- Apparition des cotylédons : 80h (Figure 10 C).

2.5. Les objectifs du stage

Le pathosystème *A. thaliana – A. brassicicola* a déjà largement été utilisé dans l'étude des interactions plante-pathogène au cours de la phase végétative de la plante et, lors de sa thèse en 2012, Stéphanie Pochon l'a transféré pour l'étude de l'interaction lors de la phase reproductive. Il a ensuite été utilisé afin de mener des études sans *a priori* (analyses des transcriptomes au cours de l'infection des siliques) et ciblées avec l'utilisation de mutants fongiques ou de divers écotypes hôtes (Pochon, 2012 ; Pochon *et al.*, 2012 ; N'Guyen, 2016). Ces travaux ont notamment permis de mettre en évidence l'implication de mécanismes de réponse du champignon face à différentes conditions environnementales (contraintes de types oxydatif et osmotique) et face aux mécanismes de défense de la plante (Thèse G. N'Guyen, 2015) lors de la transmission à la semence.

Les objectifs de mon stage s'inscrivent, dans le prolongement des travaux de S. Pochon (2012) sur la localisation d'*A. brassicicola* dans les graines d'*A. thaliana*, dans le cadre de la thèse d'Elodie Belmas, qui concernent la mise en évidence des réponses végétales lors de la germination de graines d'*Arabidopsis* contaminées. Une partie de cette thèse consiste à mettre en évidence, par une approche d'imagerie, la localisation du champignon nécrotrophe dans les tissus de la graine sèche puis au cours de la germination. Pour cela, il est nécessaire de mettre au point des coupes de graines *d'A. thaliana* qui seront par la suite associées à une observation en microscopie confocale à balayage laser.

Afin de mettre en évidence la localisation du champignon à l'intérieur de la graine, des contaminations naturelles et artificielles de graines ont été réalisées et constituent notre matériel végétal principal pour cette étude. Des coupes fines réalisées à l'aide d'un cryostat* à différents stades physiologiques (de la graine non germée à la plantule) couplées à une observation en microscopie confocale, ont été réalisées au cours de ce stage. Dans cette étude, le champignon saprophyte *Alternaria alternata* a été utilisé afin de voir si la localisation du champignon à l'intérieur des tissus de la graine est différente selon si la graine est contaminée par une souche pathogène ou une souche saprophyte.

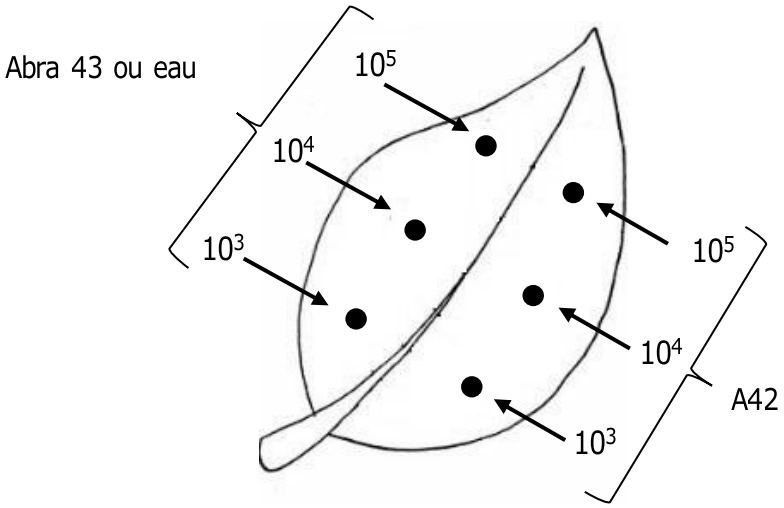


Figure 11 : Schéma représentatif de l'inoculation des feuilles de chou (Brassica oleracea) en conidies/mL

3. Matériel et Méthodes

3.1. Matériel végétal et microbiologique et inoculum

3.1.1. Matériel végétal

Dans cette étude, différentes plantes ont été utilisées. Tout d'abord des plants d'*A. thaliana* de l'écotype Landsberg *erecta* (Ler) ont été cultivées sur terreau (Traysubstrat : mélange de tourbe blonde et brune, Klassman, Brème, Allemagne) en chambre de culture à une photopériode de 16h de lumière et 8h d'obscurité et une température de 22°C à la lumière et 19°C à l'obscurité pendant 5 semaines afin d'obtenir le stade 10 siliques sur l'axe principal.

Des plants d'*A. thaliana* de l'écotype Landsberg *erecta* (Ler) et Columbia 0 (Col 0) ont été cultivées sur terreau (Traysubstrat : mélange de tourbe blonde et brune, Klassman, Brème, Allemagne) en chambre de culture à une photopériode de 8h de lumière et 16h d'obscurité et une température de 22°C à la lumière et 19°C à l'obscurité pendant 5 semaines pour l'inoculation sur rosette.

Des plants de chou (*Brassica oleracea* var. Bartolo - Bejo Seeds, Oceano, Californie) cultivés en godets 7x7 en chambre de culture (photopériode 16h de jour, 19°C nuit et 21°C jour - équipe INEM de l'IRHS) ont été utilisés au stade 3-4 feuilles vraies.

3.1.2. Matériel microbiologique

Les différentes 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) et la souche saprophyte *A. alternata 42* (Aa42 - Bessadat *et al.*, 2014). Les souches sont maintenues par repiquages successifs sur un milieu PDA (Potato Dextrose Agar : extrait de pomme de terre 0,4% (p/v) ; glucose 2% (p/v) et agar 1,5% (pv)) à 24°C.

3.1.3. Préparation des inocula

Des suspensions de conidies des souches Abra43 et Aa42 ont été réalisées à partir de cultures d'une semaine sur PDA. Les conidies ont été récupérées dans de l'eau stérile par grattage de la culture mycélienne à l'aide d'une lame de scalpel stérile. Les suspensions sont ensuite calibrées à 10^5, 10^4 et 10^3 conidies/mL à l'aide d'une cellule de Thoma.

Pour l'inoculation des siliques d'*A. thaliana*, des suspensions de conidies pour les souches Abra43 et Aa42 ont été réalisées selon le même protocole que précédemment mais en ajoutant du Tween 20 (0,01% v/v- Sigma-Aldrich, Saint-Louis, USA).

3.2. Inoculation sur plantes

3.2.1. Inoculation de choux

Afin de vérifier l'état saprophyte *d'A. alternata* 42, des choux au stade 3-4 feuilles vraies, placés dans une mini-serre au fond de laquelle de l'eau a été ajoutée, ont été inoculés par dépôt de suspension conidienne d'Abra43 et Aa42 calibrées à 10^5, 10^4 et 10^3 conidies/mL, respectivement, comme représenté sur le schéma en Figure 11.

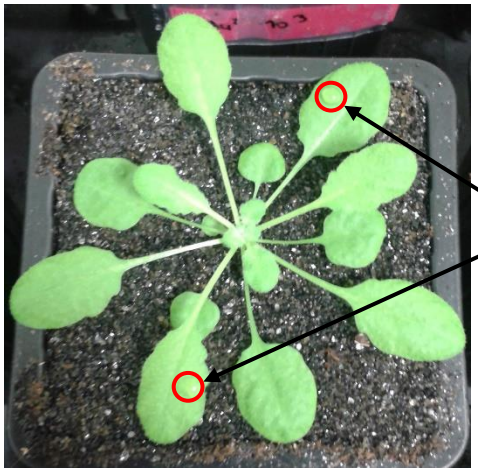


Figure 12 : Plant d'A. thaliana de l'écotype Col 0 inoculé par dépôt de conidies sur 2 feuilles de la rosette - CA

Figure 13 : Organisation d'une mini-serre pour l'inoculation sur rosette d'A. thaliana - CA

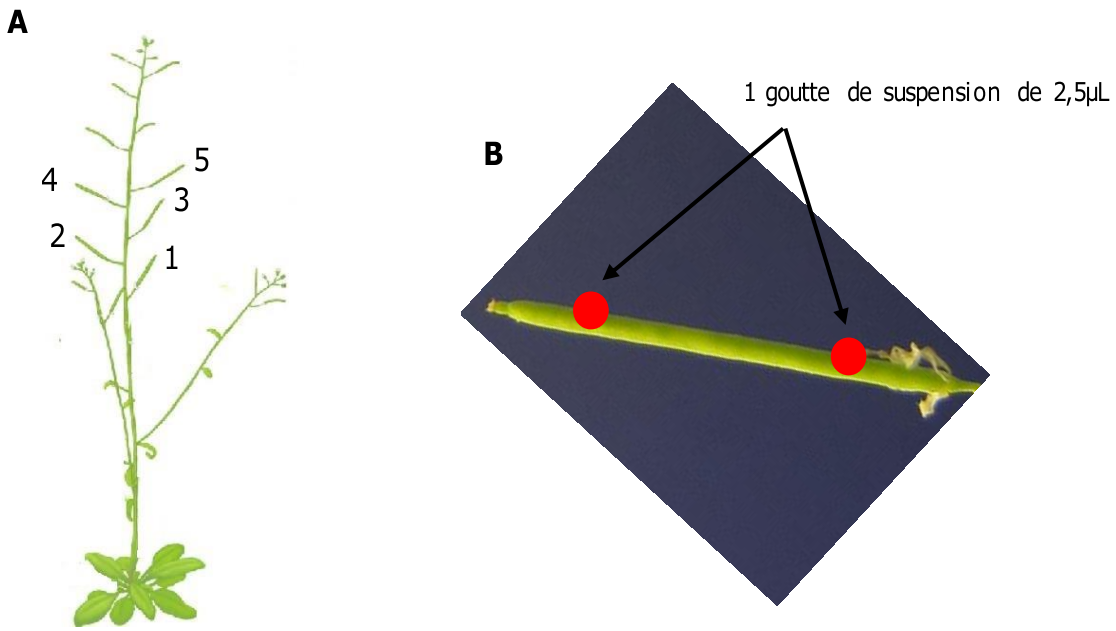


Figure 14 : Schéma représentatif de l'inoculation des siliques d'Arabidopsis thaliana (d'après Pochon, 2012*)*

***A** Numérotation des siliques (la silique 1 est la plus mature)*

B *Représentation de la localisation du dépôt des deux gouttes d'inoculum sur les siliques*

Chaque mini-serre a ensuite été recouverte d'une bâche noire pendant 48h. Durant toute la durée des expérimentations (5 à 8 jours), les mini-serres ont été placées en enceinte climatique (photopériode : 8h de jour et 16h d'obscurité, 70% d'hygrométrie et 22°C le jour et 19°C le nuit). Des photographies ont été réalisées 7 jours après l'inoculation pour permettre de comparer les symptômes produits suivant les différentes conditions.

3.2.2. Inoculation de rosette d'*A. thaliana*

Des plants d'*A. thaliana* de l'écotype Landsberg erecta (Ler) et Columbia 0 (Col 0), cultivées en enceinte climatique pendant 5 semaines ont été disposés dans 2 mini-serres au fond desquelles de l'eau a été ajoutée.

Les 2 feuilles les plus développées sur chaque plante ont été inoculées par un dépôt de 5µL d'une suspension conidienne d'Abra43 et Aa42 (Figure 12). Un témoin non inoculé est réalisé en déposant sur les feuilles une goutte de 5µL d'eau + Tween 20 (0,01% v/v). Pour chaque écotype étudié, 28 plantes réparties de façon aléatoire (Figure 13), ont été inoculées soit 4 plantes par conditions : témoin non inoculé, suspension d'Abra43 calibrée à 10^5, 10^4 et 10^3 conidies/mL, suspension d'Aa42 calibrée à 10^5, 10^4 et 10^3 conidies/mL.

Les plantes ont ensuite été placées en enceinte climatique : pendant 48 heures à l'obscurité et en humidité saturante puis de nouveau dans les conditions de culture. Des photographies ont été réalisées 7 jours après l'inoculation pour permettre de comparer les symptômes produits suivant les différentes conditions.

La surface des nécroses a été évaluée visuellement par la mesure, à l'aide d'une réglette, de 2 diamètres (D1 et D2) perpendiculaires. La surface de la nécrose a été calculée grâce à la formule suivante :

$$\mathbf{S\ (mm^2) = \pi \times (D1/2 \times D2/2)}$$ (D1 et D2 en mm et π = 3,1416)

Les mesures ont été réalisées à 7 jours après inoculation. Des tailles moyennes de nécroses avec des écarts-types ont été calculés pour chaque traitement, grâce au logiciel Excel. Ces données ont été testées statistiquement grâce au logiciel R 3.3.2. Le test de Shapiro a montré que les données 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 Tukey HSD avec un seuil de significativité de 5%.

3.3. Préparation des graines contaminées

3.3.1. Contamination naturelle par inoculation de siliques d'*A. thaliana*

Des plants d'*A. thaliana*, placés dans une mini-serre au fond de laquelle de l'eau a été ajoutée, sont répartis en fonction des 3 conditions testées (Abra43, Aa42 et témoin eau).

Neuf plantes par souche fongique testée et 9 plantes témoins ont été choisies au stade 10 siliques sur l'axe principal. Seules les 5 siliques les plus âgées ont été inoculées à chaque extrémité par un dépôt d'une goutte de 2,5µL de suspension conidienne (Figure 14) calibrée à 10^5 conidies/mL contenant du Tween 20 (0,01% v/v). Les 9 plantes témoins ont été traitées de la même manière mais avec de l'eau milliQ contenant du Tween 20 (0,01% v/v).

Les plants ont ensuite été placés en enceinte climatique à l'obscurité et avec une humidité saturante pendant 48h puis sous une photopériode de 16h de de lumière (22°C) et 8h d'obscurité (19°C) pendant environ 8 jours.

Après 10 jours, les siliques de chaque plante ont été prélevées à l'aide de pinces stériles et placées individuellement en microtubes puis conservées en chambre froide à 4°C jusqu'à l'utilisation des graines.

3.3.2. Contamination artificielle de graines d'*A. thaliana*

Des graines *d'A. thaliana* de l'écotype Ler ont été artificiellement contaminées par Abra43, Aa42 (suspensions de conidies calibrées à 10^5, 10^4 et 10^3 conidies/mL) ou traitées avec de l'eau (témoin négatif) ; elles ont servi de matériel biologique de départ pour les différentes expérimentations.

Les graines placées en microtubes de 2mL, ont tout d'abord été désinfectées par ajout d'1mL d'éthanol 70%. Après 1 mn d'incubation, les graines ont été centrifugées, le surnageant est éliminé. Un microlitre d'hypochlorite de sodium à 3% a été ajouté pendant 15 mn avant rinçages des graines à l'eau stérile.

La contamination des graines a été réalisée dans des microtubes par ajout d'1mL d'une suspension condienne d'Abra43 ou Aa42. Un témoin négatif a été réalisé par ajout d'1 mL d'eau stérile. Les graines ainsi contaminées pendant 1h ont été séchées dans des boites de Petri stériles puis stockées à 4°C en chambre froide.

3.4. Suivi de l'évolution de la maladie

Afin d'illustrer l'évolution de la maladie induite par *A. brassicicola*, des graines issues de la contamination artificielle (réalisée comme indiqué dans le paragraphe 3.3.2.) ont été semées sur milieu eau gélosée.

Les différents niveaux d'infection par le champignon nécrotrophe ou saprophyte ont pu être observés à la loupe binoculaire reliée à une caméra (Makrolite. Vision engineering, France) et grâce au logiciel Vision METCAD version 6.1.4 qui a permis de prendre des photographies des différents symptômes de la plante non contaminée au stade mort de la plante.

3.5. Localisation du champignon dans les tissus de la graine et de la plantule

3.5.1. Préparation des échantillons

Les échantillons ayant permis de réaliser les observations au microscope en fluorescence et en microscopie confocale à balayage laser sont issus des contaminations artificielles et naturelles de graines d'*A. thaliana*. Les différents stades de développement de la graine non germée à la plantule ont été observés. Pour cela, des semis sur milieu eau gélosée et sur membrane ont été réalisés de la même manière que pour les deux échelles.

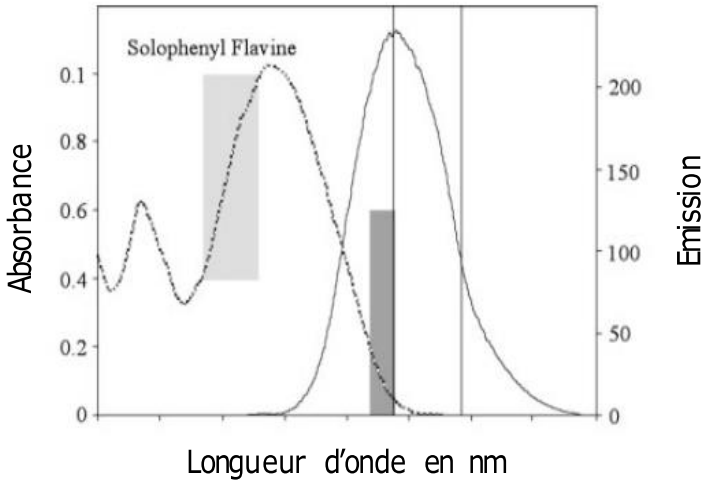


Figure 15 : Spectres d'absorption du fluorophore utilisé pour la microscopie confocale (solophényl) (Hoch et al., 2005)

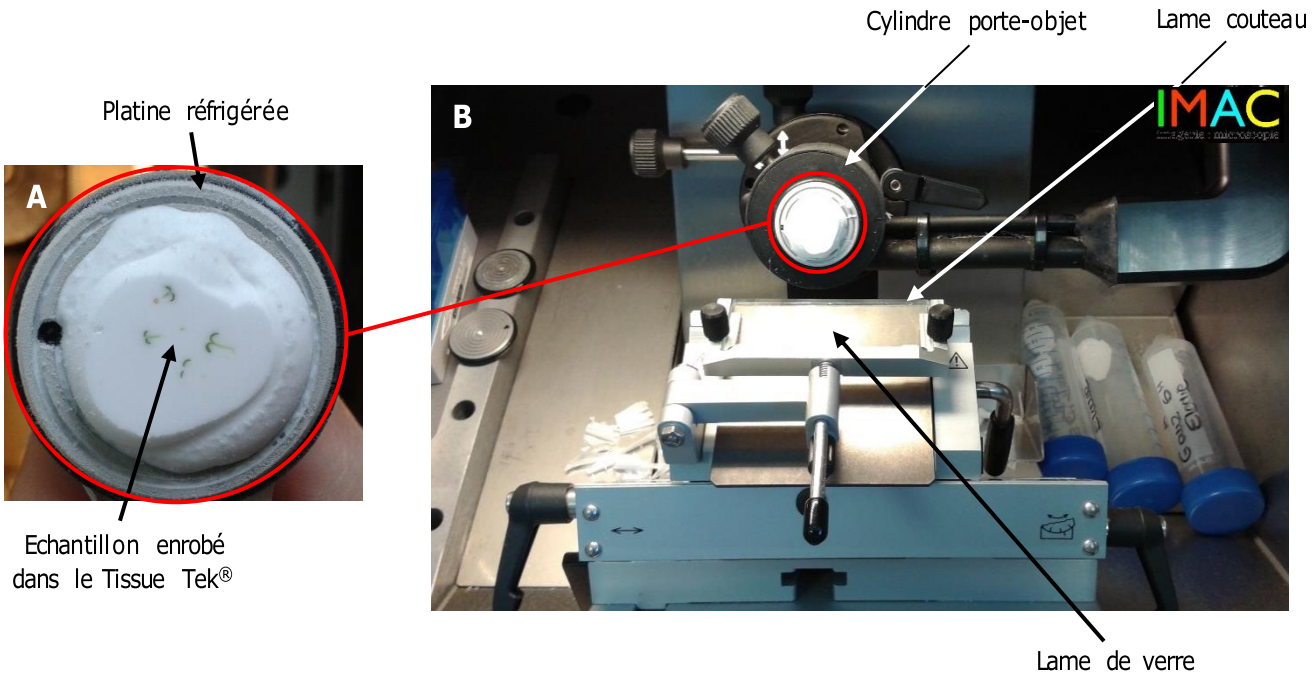


Figure 16 : Eléments du cryostat pour l'obtention des coupes de graines et de plantules - CA
A *Focus sur la platine réfrigérée et les échantillons*
B *Enceinte du cryostat réfrigérée à -20°C*

3.5.2. Coloration au solophényl et observation au microscope en fluorescence

Des graines sèches d'*A. thaliana* ont été immergées pendant 10 minutes à l'obscurité dans un bain de solophényl* flavine (Hoch *et al.*, 2005 - Figure 15) puis rincées 2 fois dans du tampon phosphate 100mM à pH 7,2. Il s'agit d'un colorant permettant de mettre en évidence les hyphes fongiques mais qui ne colore pas les conidies du champignon.

Les graines ont ensuite été montées entre lame et lamelle dans du glycérol 50% (v/v). Les lames ainsi préparées ont été conservées à l'obscurité et en chambre froide à 4°C jusqu'à l'observation.

Les échantillons ainsi colorés ont été observés au microscope DM 4500B couplé à une lampe fluorescente ebq100 (Leica, Solms, Allemagne) avec un filtre GFP-FITC (excitation à 490nm et émission à 520nm). Le logiciel Leica Application Suite a été utilisé pour acquérir les images.

3.5.3. Coupes fines de graines et plantules d'*A. thaliana*

Des coupes semi-fines de 10µm d'épaisseur de graines saines ou contaminées avec Abra43 et Aa42 pour tous les stades de développement de la plante (0h, 6h, 54h et 80h après semis des graines) ont été réalisées au cryostat (Leica CM3050S, Solms, Allemagne – Figure 16) disponible sur le plateau IMAC. Le cryostat est un instrument permettant la congélation rapide d'échantillons et la réalisation des coupes de 0,5 à 300µm d'épaisseur dans une enceinte dont la température peut être abaissée jusqu'à -40°C.

Les graines ou plantules ont été disposées dans un milieu d'enrobage Tissue Tek® (Sakura, USA), sur une platine réfrigérée pendant quelques minutes (Figure 16 A), puis fixées au cylindre porte-objet, dans l'enceinte du cryostat à -20°C. Ce milieu Tissue Tek®, composé de 10,24% d'alcool polyvinylique, 4,26% de polyéthylène glycol et 85,50% d'ingrédients non réactifs, est un support d'incorporation qui lie, entoure et recouvre l'échantillon pour permettre d'obtenir une température de coupe optimale. Les échantillons ainsi préparés peuvent être conservés à -80°C jusqu'à la coupe.

Les échantillons ont ensuite été coupés avec une lame couteau en acier. Les coupes ont été récupérées sur une lame porte objet (SuperFrost® Plus, Menzel-glazer, Allemagne) et conservées à l'obscurité et à 4°C jusqu'à la coloration et à l'observation en microscopie.

3.5.4. Coloration au solophényl de graines et observation en microscopie confocale à balayage laser

Les coupes réalisées au cryostat ont été colorées au solophényl directement sur la lame pendant 10 minutes à l'obscurité. Les lames ont ensuite été lavées dans du tampon phosphate 100mM à pH 7,2. Les coupes sont montées entre lame et lamelle dans du glycérol 50% (v/v), et conservées à l'obscurité et à 4°C jusqu'à l'observation en microscopie confocale à balayage laser (NIKON A1 – NIKON Instruments Europe, France - plateau IMAC). Des essais avec un autre milieu de montage utilisé au SCIAM ont également été réalisés. Il s'agit du fluoromount (Sigma-Aldrich, Saint-Louis, USA).

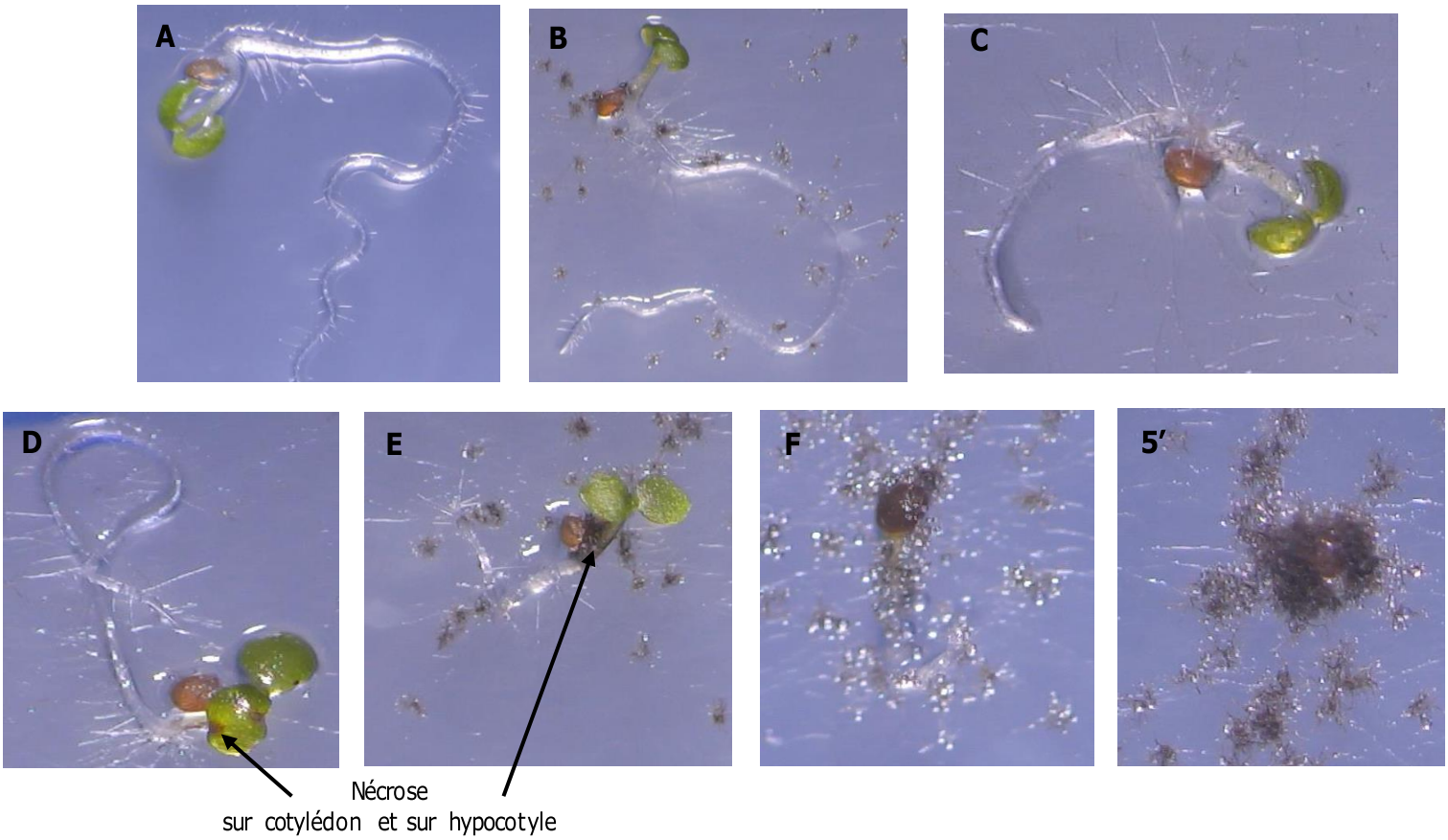


Figure 17 : Suivi du développement de la maladie induite par Abra 43WT sur graine et plantule d'A. thaliana
A *plante non contaminée,* **B** *présence du champignon sur l'enveloppe,* **C** *présence du champignon sur toute la plantule,* **D** *Nécroses sur les cotylédons,* **E** *Nécroses sur les cotylédons et l'hypocotyle,*
F *Mort de la plantule,* **F'** *Graine non germée contaminée*

4. Résultats

4.1. Développement de la maladie

Dans un premier temps, des graines artificiellement contaminées par *A. brassicicola* ont été semées sur un milieu eau gélosée afin d'observer le développement de la maladie à l'échelle macroscopique et de suivre le développement de la maladie du stade de graine sèche au stade de jeune plantule (Figure 17). Une fois semées, les graines sont incubées dans une enceinte climatique pour une durée de 10 jours au cours de laquelle le développement de la maladie à la loupe binoculaire a été suivi. Avant la germination, le champignon se développe à la surface de la graine mais peut aussi pénétrer à l'intérieur. Ensuite, une fois que la plantule est pleinement développée, il a été possible d'observer plusieurs cas de figure :

- le champignon peut se développer sur la graine mais ne peut pas affecter la plantule, dans ce cas il reste au niveau de l'enveloppe de la graine après la germination (Figure 17 B)
- le champignon se développe au niveau de la graine et colonise la totalité de la plantule sans toutefois engendrer de symptômes. Dans ce cas, on observe la présence de conidies sur l'enveloppe mais également au niveau de l'hypocotyle et des cotylédons (Figure 17 C)
- le champignon se développe sur toute la plante et déclenche l'apparition de nécroses au niveau des cotylédons (Figure 17 D)
- le champignon peut entrainer l'apparition de symptômes de nécroses au niveau des cotylédons mais aussi au niveau de l'hypocotyle lorsque la maladie est plus sévère (Figure 17 E)
- Enfin dans certains cas, le développement de la maladie peut aller jusqu'à la mort de la plante lorsque celle-ci est toute nécrosée (Figure 17 F).

Ce test ayant été réalisé sur des graines contaminées artificiellement, chaque graine présente potentiellement la même charge en pathogène et cela permet d'obtenir un lot de semences contaminées homogène. Ces observations montrent que même si les graines ont été contaminées de la même façon, l'issue du développement de la maladie n'est pas toujours le même. C'est également pour cette raison qu'il est intéressant de regarder à l'intérieur des graines afin de voir où se situe plus précisément le champignon.

Les photographies présentées dans cette figure montrent des graines et plantules contaminées par Abra43, les résultats obtenus après une inoculation par Aa42 (souche saprophyte) mettent en évidence des symptômes similaires. Le but de mon stage étant de comparer l'impact d'une souche pathogène à celui d'une souche saprophyte sur des graines en germination, il est primordial de vérifier la pathogénicité des deux souches Abra43 et Aa42 pour confirmer que l'on travaille bien sur une souche pathogène et une souche saprophyte.

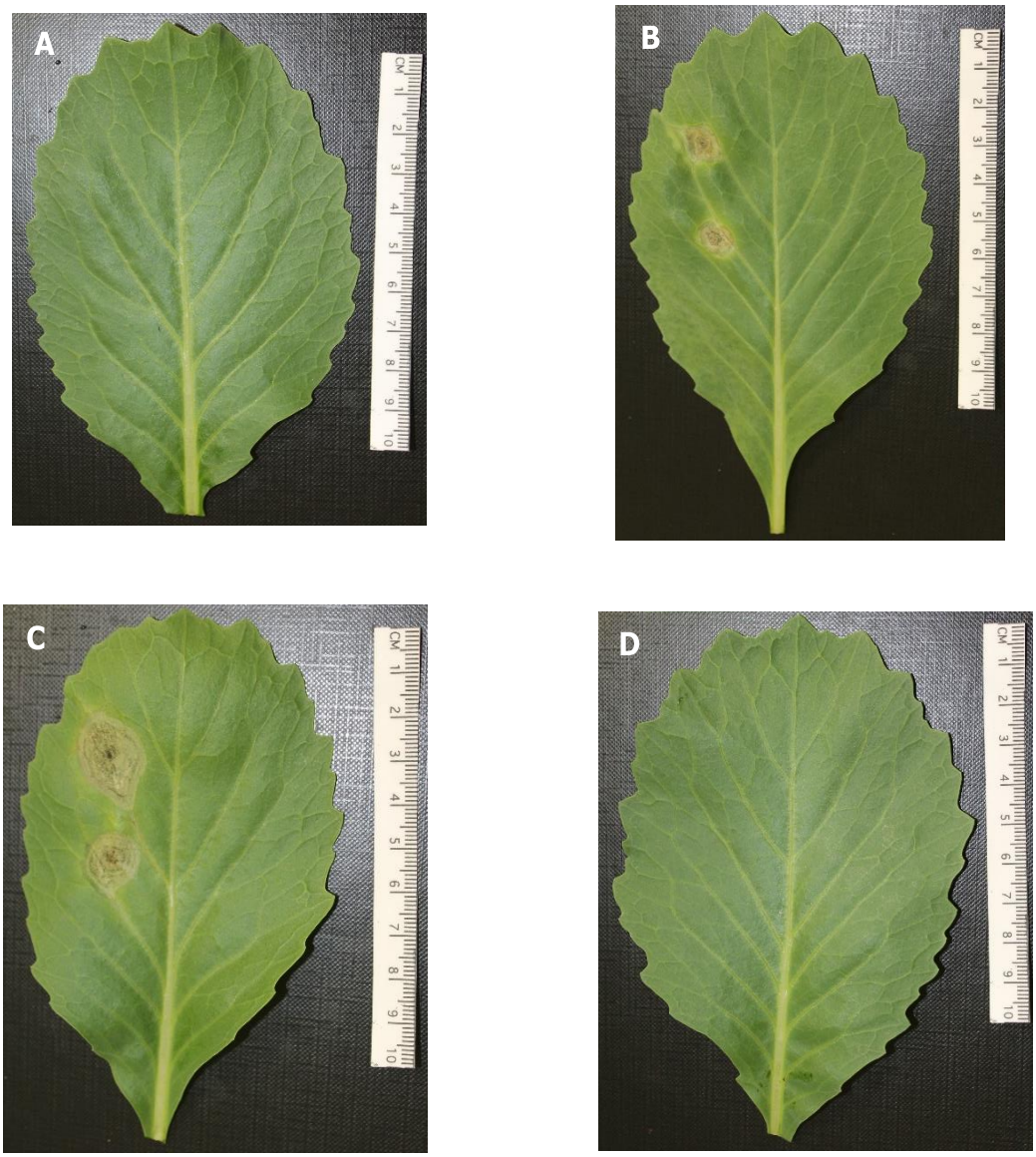


Figure 18 : Observation des symptômes sur feuilles de chou 8 jours après inoculation par dépôt de conidies des souches Abra43 WT et A. alternata 42 calibrées à 10^5, 10^4 et 10^3 conidies/mL
A *: feuille traitée avec de l'eau (témoin négatif),* **B** *: feuille inoculée côté gauche avec Abra43 WT et côté droit avec Aa42,* **C** *: feuille inoculée avec Abra43 WT,* **D** *: feuille traitée avec Aa42*

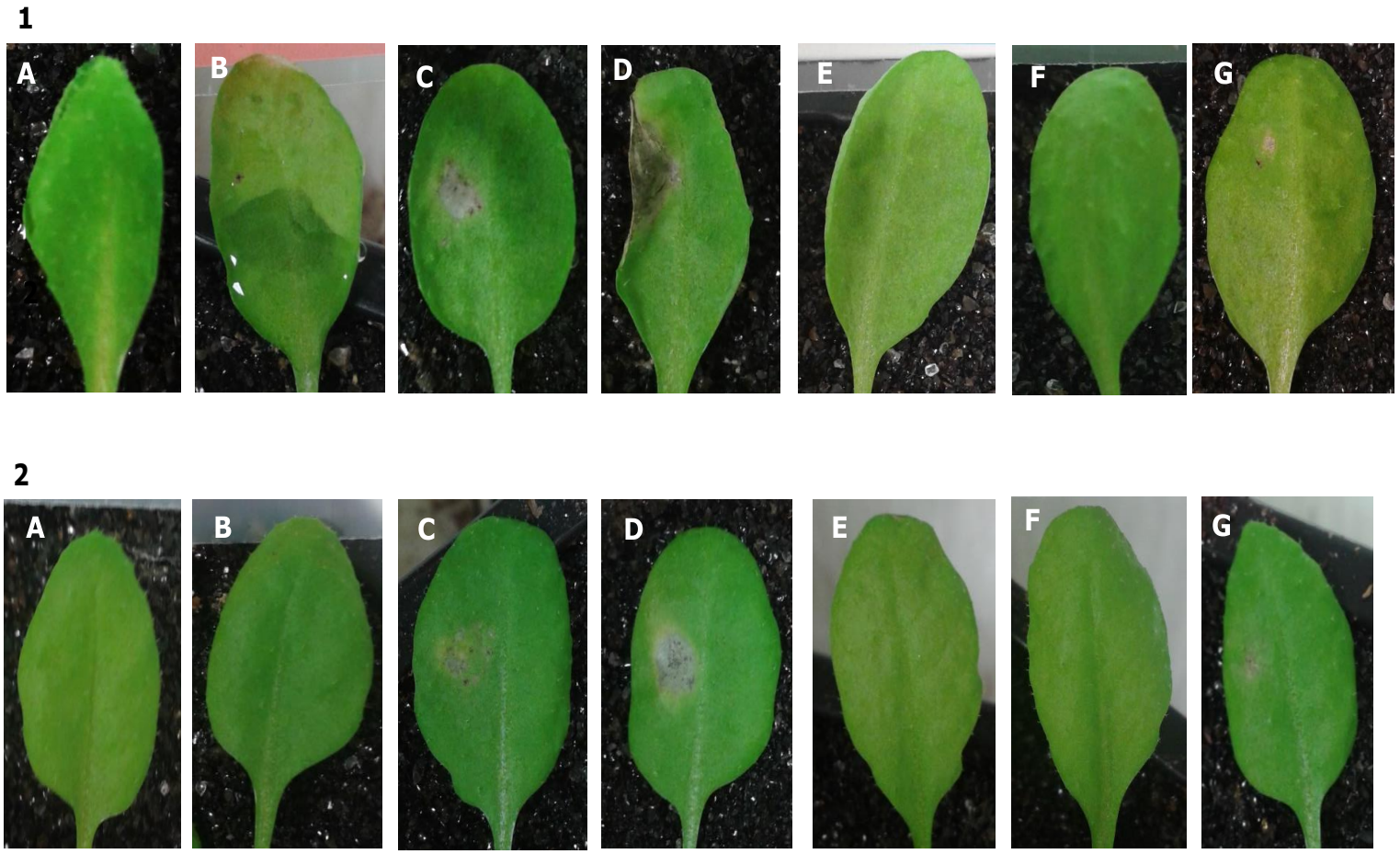


Figure 19 : Observation des symptômes sur rosette d'A. thaliana 7 jours après inoculation par dépôt de conidies des souches Abra43 WT et A. alternata 42 calibrées à 10^5, 10^4 et 10^3 conidies/mL.

1 *: Ecotype Ler,* **2** *: Ecotype Col0*

A *: feuille traitée avec de l'eau (témoin négatif),* **B à D** *: feuilles inoculées côté gauche avec Abra43 WT, à une concentration de 10^3, 10^4 et 10^5 respectivement* **E à G** *: feuilles inoculées avec Aa42, à une concentration de 10^3, 10^4 et 10^5 respectivement*

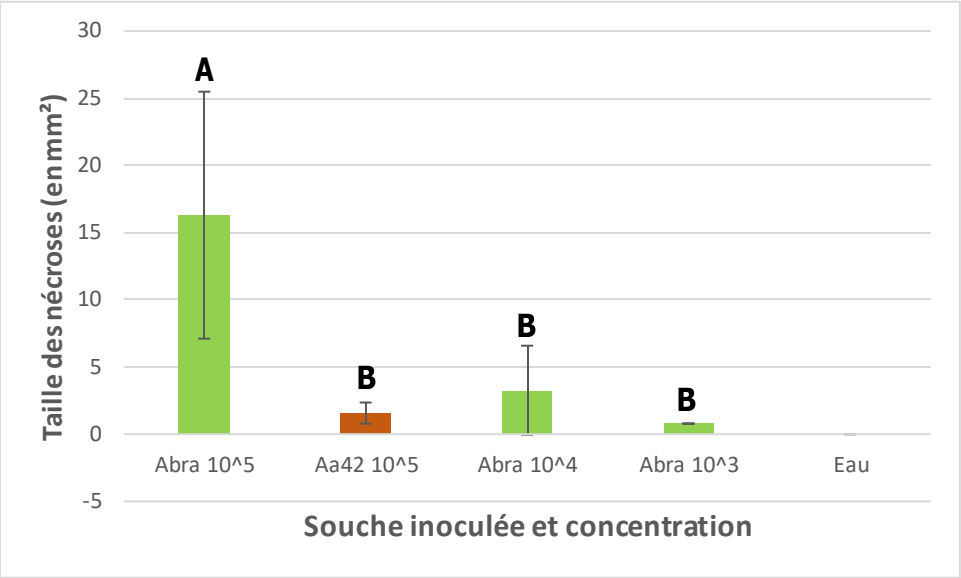


Figure 20 : Mesure de la taille des nécroses (mesurée manuellement) sur feuilles d'A. thaliana de l'écotype Ler 7 jours après une inoculation par les souches Abra43, Aa42 et eau à des concentrations de 10^5, 10^4 et 10^3 conidies/mL (moyenne ± écart types et lettres de significativité A et B correspondent aux différents groupes homogènes déterminés grâce au test de Kruskal-Wallis combinée à la comparaison multiple de Tukey)

4.2. Vérification de la pathogénicité des souches fongiques

4.2.1. Inoculation sur feuille de chou

Une série de plants de choux a été inoculée avec des suspensions calibrées de conidies d'Abra43, Aa42 ou traitée avec de l'eau, et observée 8 jours après inoculation. Des photographies ont été prises en fin d'expérimentation (8 jours) afin de pouvoir comparer les symptômes provoqués par la souche pathogène, Abra43 et la souche saprophyte, Aa42.

Aucune nécrose ne s'est développée sur les feuilles témoins (Figure 17 A) qui ont été traitées avec de l'eau. Il en est de même pour les feuilles inoculées avec la souche 42 d'*A. alternata*, quelle que soit la concentration appliquée (Figure 17 D). Des nécroses avec la souche Abra43 WT, visibles dès le 3ème jour après l'inoculation, sont présentes sur les feuilles de chou (Figure 17 C). Il faut noter que la taille des nécroses est plus importante avec une suspension de conidies calibrée à 10^5 conidies/mL qu'avec une inoculation avec une suspension calibrée à 10^3 conidies/mL.

Ces résultats sur feuilles de chou ont permis de vérifier les différences de pathogénicité entre les deux souches.

4.2.2. Inoculation sur rosette d'*A. thaliana*

Pour tester la pathogénicité des deux souches également sur feuilles de rosettes *d'Arabidopsis*, deux écotypes Ler et Col 0, connus pour leur différence de sensibilité à *A.brassicicola* ont été inoculés avec des suspensions calibrées de conidies d'Abra43, Aa42 ou traités avec de l'eau. Les symptômes ont été observés 7 jours après inoculation (Figure 19) et la taille des nécroses a été mesurée (Figure 20).

Lorsqu'on inocule avec *A. brassicicola*, quel que soit l'écotype, plus la suspension conidienne est concentrée, plus la taille des nécroses est importante (Figure 20). L'écotype Ler étant plus sensible que l'écotype Col0.

Lorsqu'on inocule avec *A. alternata* (Aa42), des nécroses de faible taille (environ 1,5 mm²), ont été observées au niveau de la zone de dépôt de la goutte pour les deux écotypes après inoculation à 10^5 conidies/mL. Ces nécroses ne progressent pas par la suite et ne sont pas présentes lorsqu'on diminue la charge en champignon. Nous considérons donc qu'il ne s'agit pas de symptômes liés au développement du champignon dans les tissus mais d'une simple réaction non hôte liée au dépôt.

Une différence de pathogénicité d'Abra43 (souche pathogène) par rapport à la Aa42 (souche saprophyte) a donc pu être démontrée

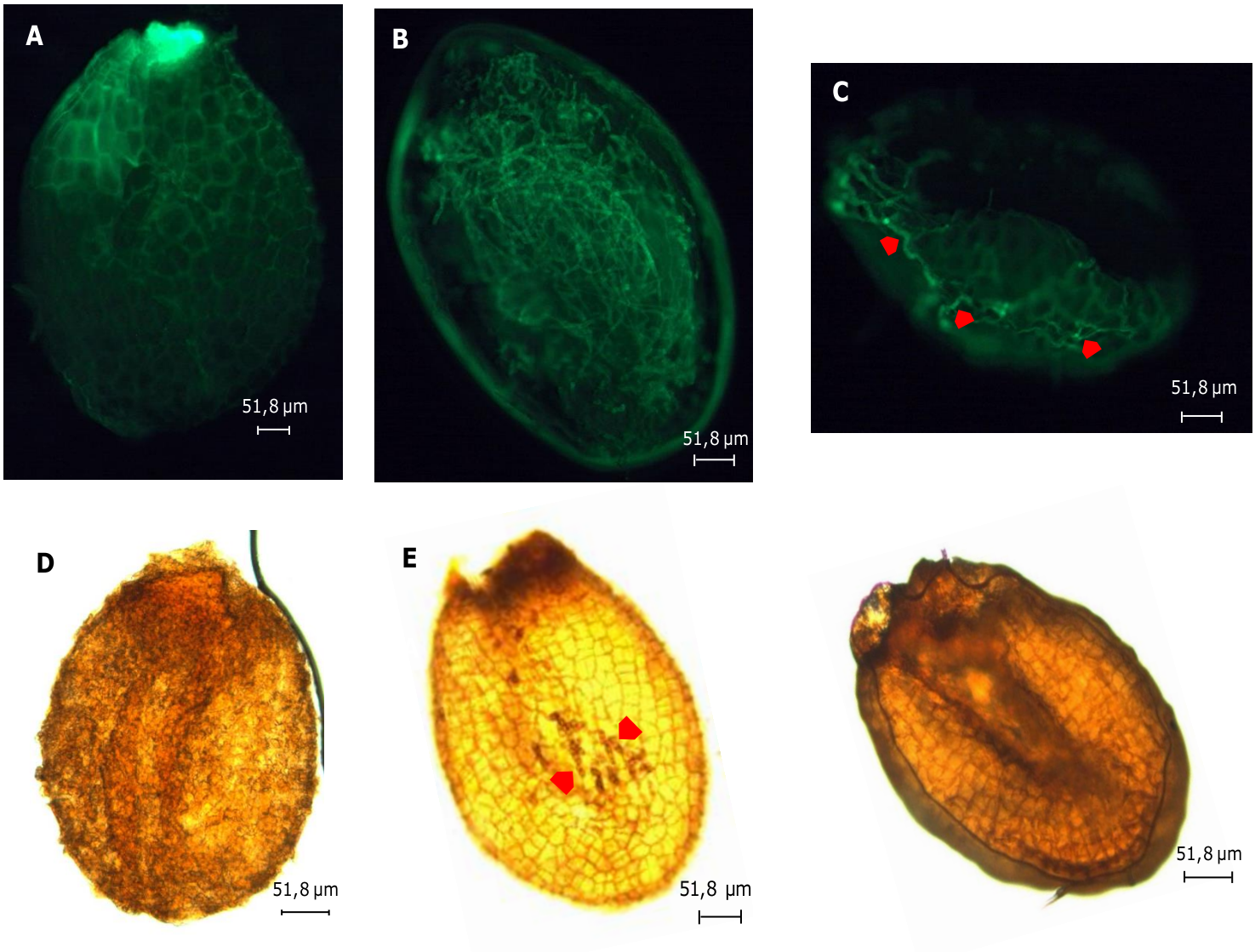


Figure 21 : Illustrations de graines entières artificiellement contaminées, colorées au solophényl et observées au microscope en fluorescence avec un filtre GFP-FITC et correspondance en lumière blanche.
***A et D** Graine non contaminée **B et E** Graine infectée par Abra43 WT (les têtes de flèches montrent des conidies) **C et F** Graine contaminée par Aa42 (les têtes de flèche mettent en évidence la présence de mycélium)*

4.3. Observation de graines entières en microscopie à fluorescence

Les observations au microscope en fluorescence ont été réalisées sur des graines entières infectées ou non, après une coloration au solophényl des hyphes fongiques. Les graines ont été colorées avec du solophényl qui permet la visualisation en fluorescence grâce à un filtre GFP-FITC. Les images présentées dans la figure 21 correspondent aux trois conditions testées : inoculation par Abra43, Aa42 et témoin eau. Les images en fluorescence sont mises en regard avec les images prises en lumière blanche permettant de visualiser l'ensemble de la graine.

La coloration d'une graine saine permet de mettre en évidence l'intégrité de la structure d'une graine d'*A. thaliana* (Figure 21 A et D). Les figures 13 B et E présentent une graine contaminée par Abra43, sur l'image en lumière blanche des conidies sont présentes en surface de la graine. Cette observation est reliée avec l'observation en fluorescence de cette même graine. En effet, un mycélium abondant est observé sur l'ensemble de la graine et semble la recouvrir. Les figures 13 C et F présentent une graine contaminée par Aa42, il a également été possible de mettre en évidence la présence de mycélium autour de la graine.

A ce stade, l'observation en fluorescence permet de confirmer que le solophényl colore bien les hyphes fongiques mais pas les conidies (visibles en lumière blanche – Figure 21 E). L'observation des graines entières permet de vérifier qu'il y a bien présence d'un mycélium entourant les graines. Cependant, il n'est pas possible à partir de graines entières de mettre en évidence une éventuelle différence de localisation entre la souche pathogène Abra43 et la souche saprophyte Aa42. L'observation des graines en fluorescence ne permet pas de donner plus d'informations que l'imagerie confocale à balayage laser sur graine entière, c'est pour cela que nous proposons de réaliser des coupes de graines au cours de la germination afin de montrer une éventuelle différence de localisation entre les deux souches.

4.4. Mise au point de coupes de graines au cryostat

Des coupes de graines ont été effectuées afin de mieux comprendre la dynamique de colonisation d'une souche pathogène vis-à-vis d'une souche saprophyte et de déterminer avec plus de précision la localisation en profondeur du champignon dans les tissus de la graine. Les travaux antérieurs étaient focalisés sur la graine sèche. Dans cette étude, les manipulations et observations sont réalisées sur des échantillons représentatifs d'une cinétique de germination de 0 à 80h après semis (stade plantule). Les coupes de graines sont habituellement réalisées sur des graines imbibées afin de rendre les tissus plus mous mais dans cette étude le stade de graine sèche est important puisqu'il constitue le point de départ de notre cinétique. Il est donc primordial d'obtenir des coupes de ce stade particulier et de pouvoir suivre l'évolution de la localisation du champignon en fonction du développement de la plante.

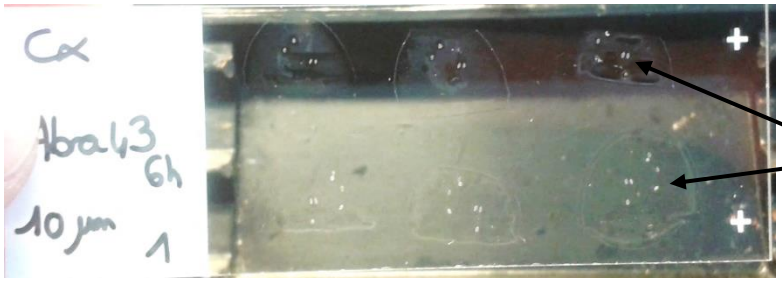


Figure 22 : Coupes de graines (6h) réalisées au cryostat (IMAC) disposées sur une lame porte-objet). Lame prête pour la coloration en vue de l'observation en microscopie confocale

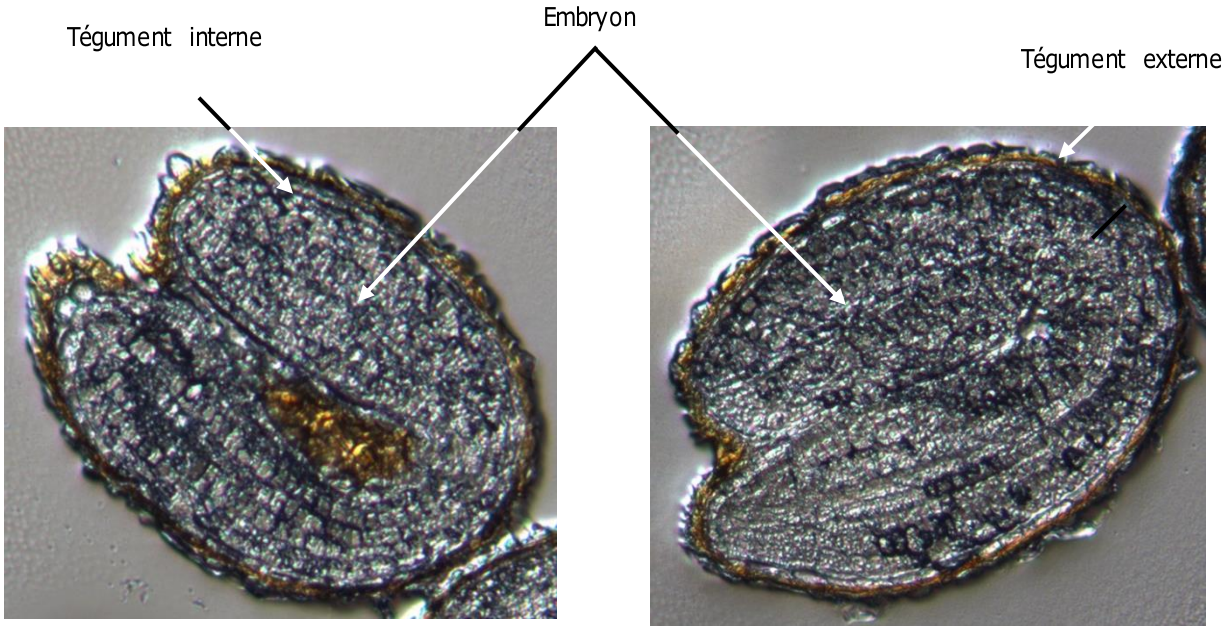


Figure 23 : Illustrations de coupes de graines (10µm) non contaminées à 0h observées au microscope au grossissement x10 (photos IMAC)

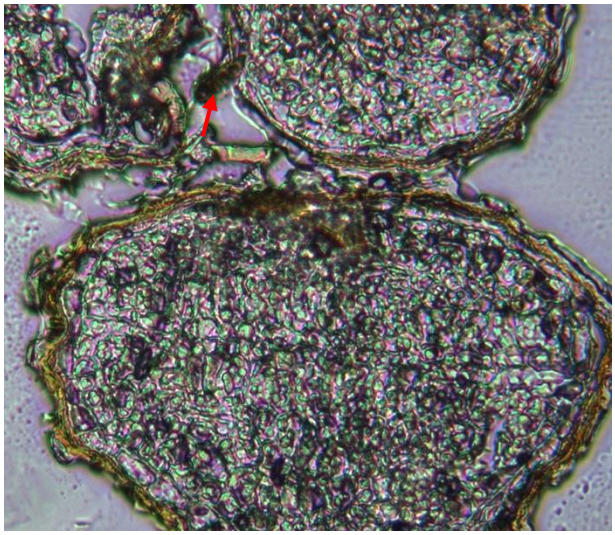


Figure 24 : Illustrations de coupes de graines (7µm) contaminées par Abra43 WT à 0h observées au microscope au grossissement x20 (photos IMAC) La flèche rouge indique la présence du champignon

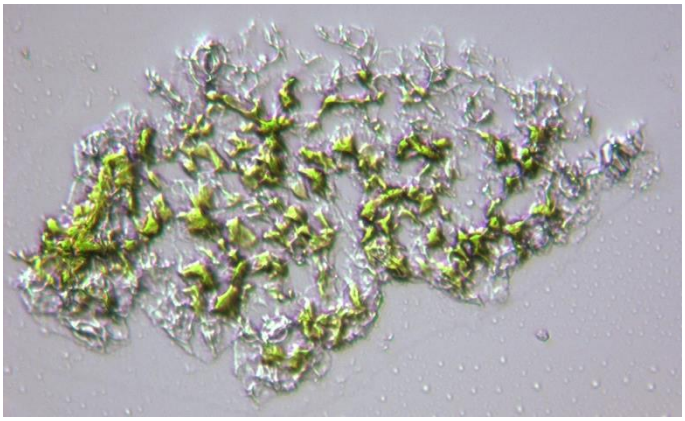


Figure 25 : Illustrations de coupes de plantule à 80h (10µm) contaminées par Abra43 WT observées au microscope au grossissement x20 (photos IMAC)

Les tissus de la graine d'*A. thaliana* étant très fragiles il a été choisi de réaliser les coupes dans l'enceinte d'un cryostat à -20°C en plaçant les échantillons dans un tissu d'enrobage permettant de lier les échantillons et de les couper à une température optimale. Le gel Tissue Tek® qui ne laisse aucun résidu au contact de la lame permet de déposer les coupes sur la lame sans les endommager (Figure 22). Il est ainsi possible selon la taille de l'échantillon de disposer plusieurs coupes de graines sur une lame permettant de faciliter les colorations et l'observation au microscope. Cette technique permet donc bien de réaliser des coupes de graines sèches, imbibées ou à des stades de développement plus tardifs.

Une fois déposées sur une lame, les coupes ont été observées au microscope photonique à fond clair afin de vérifier que les échantillons ne s'étaient pas abîmés. Les images présentées dans la figure 23 montrent des coupes de graines non contaminées de 10µm d'épaisseur. Il est ainsi possible de voir que les graines ont été coupées sans être endommagées et que l'on peut distinguer les différents tissus de la graine : tégument externe et interne et l'embryon. Des observations de coupes de graines contaminées par Abra43 ont permis de mettre en évidence la présence du champignon dans les tissus de la graine (Figure 24).

Des observations de coupes réalisées sur des jeunes plantules, permettent de montrer que les coupes sur ces organes très fragiles que sont les cotylédons sont réalisables et pourraient permettre après coloration une visualisation de la présence du champignon dans les tissus cotylédonaires (Figure 25).

4.5. Observations des coupes en microscopie confocale à balayage laser

Les souches fongiques utilisées pour contaminer les graines n'étant pas marquées (par un fluorochrome par exemple), il est donc nécessaire de les colorer afin de pouvoir les observer en microscopie confocale à balayage laser. Après vérification de l'intégrité des échantillons, les coupes ont été colorées au solophényl puis montées entre lame et lamelle dans du glycérol. Les résultats obtenus n'ont pas permis d'obtenir des lames observables au microscope confocal. Différentes hypothèses ont été proposées afin d'essayer de trouver l'origine de l'altération des coupes pendant l'étape de montage suivant la coloration. Ainsi, l'effet de la température ambiante sur les coupes, l'effet de l'étape de coloration ainsi que le montage ont été mis en cause.

De plus, le protocole utilisé (identique à celui utilisé par S. Pochon en 2012), ne prévoit pas de fixation des échantillons avant la coloration. Cela peut donc entrainer un décollement des coupes pendant le montage.

5. Discussion

La transmission à et par les semences est une étape clé du cycle de développement de certains agents phytopathogènes et notamment d'*A. brassicicola*. Cet agent pathogène, responsable de la maladie des taches noires sur les Brassicacées engendre des pertes de rendement importantes. Ainsi, il est primordial d'améliorer la compréhension des mécanismes de transmission du pathogène à la semence afin de trouver de nouveaux moyens de lutte contre la maladie et d'assurer une bonne qualité sanitaire des lots de semences. Afin de répondre à cette problématique, l'équipe FungiSem a mis en place le pathosystème modèle *A. brassicicola* / *A. thaliana* afin d'étudier la transmission du champignon de la plante mère à la semence (Pochon, 2012 ; N'Guyen, 2015). Il est maintenant utilisé dans le cadre de la thèse d'E. Belmas pour l'étude du pathogène par la semence.

Jusqu'à présent, les travaux réalisés se focalisaient sur la phase de transmission de l'agent pathogène à la graine sèche. Afin d'améliorer la compréhension de la dynamique d'infection d'une graine par le champignon et de mieux localiser ce dernier dans les tissus, nous nous sommes intéressé au devenir du champignon au cours de la germination de la graine. Ainsi, des cinétiques de germination ont été réalisées avant mon arrivée pour identifier les stades physiologiques clés de germination de la graine jusqu'à l'obtention du stade plantule. L'échelle de développement qui découle de cette expérimentation a permis de se focaliser uniquement sur quatre stades clés pour l'ensemble des études. On cherche ainsi à mieux comprendre les mécanismes d'infection ayant lieu durant tout le processus de germination en s'intéressant à 4 stades de développement particuliers de la plante : graine sèche, 6h d'imbibition, émergence de la radicule (54h après semis), plantule (80h après semis). Ces 4 points feront l'objet d'une comparaison entre une contamination par une souche *d'Alternaria* pathogène (Abra43) ou par une souche *d'Alternaria* saprophyte (Aa42).

Lors de sa thèse, Stéphanie Pochon a fait une étude tissulaire et cellulaire de la transmission du champignon aux semences d'*A. thaliana* à travers la silique. Elle a notamment montré par microscopie électronique à balayage que le mycélium colonise activement la surface de la graine en produisant ponctuellement des conidies (Pochon *et al.*, 2012) et des points de pénétration ont été observés, laissant supposer que le champignon pénètre à l'intérieur de la graine. Toutefois, elle n'a pas pu déterminer la profondeur jusqu'à laquelle le champignon colonise les tissus de la graine bien qu'en 2010 une étude ait montré qu'en cas d'attaques sévères, le champignon peut atteindre les tissus embryonnaires (Kohl *et al.*, 2010). De plus, E. Belmas au cours de sa thèse au sein de l'équipe FungiSem a pu observer que des graines présentant un niveau de contamination élevé sont également affectées dans leur capacité germinative, suggérant que l'embryon puisse être impacté dans certains cas par la présence du mycète.

E. Belmas a également observé des graines à différents stades de germination en microscopie électronique à balayage. Ces observations ont permis de confirmer que le mycélium d'*A. brassicicola* se développe de façon superficielle sur la graine avant de pénétrer à l'intérieur du tégument. Il semblerait que cette pénétration se fasse soit directement, soit indirectement, à travers des brèches à la surface de la graine (Figure 26).

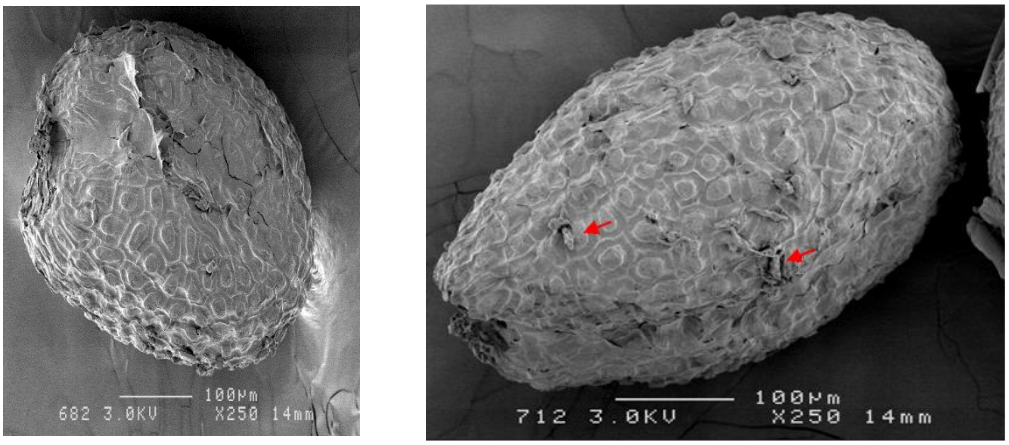


Figure 26 : Localisation d'A. brassicicola sur des graines d'A. thaliana pendant la germination, au stade de graine sèche (a) au stade d'imbibition de la graine (b) Les flèches montrent le champignon. (E. Belmas)

Même lorsque le champignon est inoculé sur la graine de façon artificielle, il est capable de la coloniser de façon active puisque les conidies sont capables de germer et de former un mycélium. Lorsqu'on prend la cinétique de germination de la graine dans son ensemble, le champignon pénètre à l'intérieur du tégument aux stades de graine sèche et de graine imbibée mais lorsque celle-ci germe, il reste au niveau de l'enveloppe de la graine et n'atteint pas la racine ni les cotylédons lorsqu'on arrive au stade plantule.

Bien qu'*A. alternata* soit un saprophyte, aucune différence n'a pu être mise en évidence par rapport à la souche pathogène d'un point de vue microscopique concernant le développement du champignon sur la graine jusqu'au stade plantule. Aux stades de graine (0h) et de graine imbibée (6h), le champignon pénètre à l'intérieur du tégument de la graine mais lorsque celle-ci germe, il semble rester au niveau de l'enveloppe et ne pas atteindre la plantule. En effet, des nécroses de petite taille sont visibles après l'inoculation de cette souche, celles-ci ne progressent pas par la suite donc nous considérons qu'il ne s'agit pas de symptômes liés au développement du champignon dans les tissus mais d'une simple réaction non hôte liée au dépôt. De plus, le milieu eau gélosée contenant des sucres, le champignon est dans les conditions optimales pour son développement.

L'enjeu technique de ce stage consistait en la réalisation de coupes fines de graines d'*A. thaliana* à différents temps physiologiques, dans le but de pouvoir étudier la localisation du champignon pendant la germination de la graine et ce de 0 à 80h après semis, le dernier stade correspondant au stade plantule. La réalisation de ces coupes constitue un défi technique du fait de la fragilité du matériel végétal utilisé.

La technique mise en place a permis d'obtenir des coupes de bonne qualité présentant des tissus intacts. Elle consiste à couper les échantillons dans un gel à l'intérieur d'une enceinte réfrigérée à -20°C. C'est également une technique rapide car elle permet d'utiliser les échantillons directement à l'état frais en s'affranchissant de l'étape de fixation généralement nécessaire avant d'inclure. Ces coupes constituent notre matériel biologique de départ pour les observations en microscopie confocale à balayage laser après coloration du champignon.

De plus, la technique de coupe utilisée est fastidieuse et très délicate à mettre en œuvre, elle engendre beaucoup de pertes de coupes du fait de la perte d'intégrité des tissus lors de celle-ci. Il est ainsi particulièrement compliqué de travailler sur un nombre d'échantillons satisfaisant. L'objectif final est d'observer un grand nombre de graines au cours du processus de germination afin de localiser avec plus de précision la souche pathogène ainsi que la souche saprophyte dans les tissus de la graine en germination.

La coloration de graines entières a permis de mettre en évidence la présence d'un mycélium abondant sur les graines contaminées par Abra43 comme l'avait déjà montré S. Pochon en 2012 par une approche d'imagerie confocale à balayage laser. Ces observations ont permis de confirmer la faisabilité de la coloration sur graines entières et ainsi d'essayer de transférer cette technique sur les coupes de graines.

Lors de la coloration et du montage des coupes de graines, des problèmes ont été rencontrés concernant le maintien des coupes sur la lame. Il a été montré que c'est lors du montage entre lame et lamelle que les coupes sont perdues ou abîmées. Plusieurs facteurs ont donc été testés afin d'en identifier la cause :

- Effet de la température : le fait de mettre les coupes à température ambiante pendant la coloration et avant l'observation a été mis en cause mais nous avons constaté que les coupes restent intactes.
- Effet de la coloration : Le colorant en lui-même ou l'opération de lavage au tampon phosphate peut également poser problème. Le milieu de montage, le glycérol a également été remplacé par le fluoromount utilisé au SCIAM, mais les résultats obtenus avec les deux milieux de montage ne sont pas satisfaisants.

Ces observations nous ont conduit à penser que les coupes ne se maintiennent pas ou sont écrasées lorsqu'elles sont mises dans le milieu de montage et recouvertes par la lamelle. Il a été choisi d'ajouter de l'adhésif double face entre la lame et la lamelle au moment du montage pour surélever cette dernière et éviter l'écrasement des coupes. Les résultats obtenus n'ont pas permis d'obtenir des lames observables au microscope confocal.

De plus, le protocole utilisé, ne prévoyant pas de fixation des échantillons avant la coloration. Il aurait été intéressant de faire un test en fixant les échantillons avant de faire le montage afin de les préserver. Cependant cette fixation doit être réalisée en suivant un protocole compatible avec l'observation en microscopie confocale à balayage laser. Ce type de fixation, nécessite l'utilisation d'isopentane refroidi que ne possède pas le plateau IMAC. Par soucis de temps ce protocole n'a donc pas pu être testé au cours de mon stage car cela aurait nécessité d'aller travailler sur une autre plateforme (SCIAM)

La coloration constituant une limitation importante, la solution serait de s'en affranchir en utilisant une souche de champignon marquée constitutivement par des protéines fluorescentes. En effet, une souche marquée pour le champignon saprophyte Aa42 est déjà disponible au laboratoire et pourrait donc permettre de faire des premiers essais. Pour cela, des contaminations artificielles et naturelles devront être réalisées avec cette souche marquée pour obtenir du matériel biologique. Actuellement, l'équipe ne possède pas de souche équivalente pour *A. brassicicola,* rendant l'étape de coloration nécessaire au moins pour cette espèce. Il serait donc intéressant de générer une souche d'*A. brassicicola* porteur d'un gène codant un deuxième fluorochrome sous le contrôle d'un promoteur constitutif. Ainsi, les coupes pourront directement être montées entre lame et lamelle dans un milieu de montage en s'affranchissant de la coloration.

Afin d'observer l'intérieur des graines et les plantules d'*Arabidopsis*, une alternative serait d'inclure les échantillons dans des blocs de résine, et de faire des observations en microscopie électronique à transmission. Cette technique est toutefois beaucoup plus longue et coûteuse. La limite de cette technique est notamment la difficulté à faire pénétrer l'agent fixateur à l'intérieur de la graine (particulièrement au stade de graine sèche).

6. Conclusions et perspectives

La maladie du black spot des Brassicacées impacte de nombreuses plantes d'intérêt agronomique de la famille des Brassicacées : le chou (*Brassica oleracea*), le navet (*Brassica rapa* L. subsp. *rapa*), le colza (*Brassica napus*) ou encore la moutarde (*Sinapis alba*). Ces pertes économiques importantes peuvent impacter les intervenants de la filière semence mais également les producteurs (Pochon, 2012). L'étude des mécanismes impliqués dans les étapes de transmission à et par les semences ainsi que de la localisation du champignon au cours du processus d'imbibition de la graine est primordiale pour pouvoir agir et trouver des moyens de lutte.

Cette étude avait pour but de poursuivre les travaux de S. Pochon en 2012 sur la localisation d'un champignon pathogène dans les tissus au cours de la germination de la graine. Ainsi la mise en place d'une technique histologique visant à réaliser des coupes de graines et de jeunes plantules a été réalisée avec succès. La réalisation de ces coupes constituait le défi technique de ce stage du fait de la fragilité des graines étudiées. La technique de coupes au cryostat pourra être utilisée en routine par la suite pour les différents travaux réalisés sur la localisation d'un agent pathogène dans les tissus internes de la graine. Il est possible également d'élargir cette technique à d'autres pathosystèmes impliqués dans une phase de transmission à et par les semences.

En raison de problèmes d'intégrité des coupes après la phase de coloration et de montage, les résultats présentés dans ce rapport ne permettent pas encore de visualiser une souche de champignon pathogène, Abra43, et de comparer sa localisation à celle d'une souche saprophyte, Aa42. Néanmoins les observations précédentes concernant le développement d'un mycélium abondant autour des graines contaminées et la présence de points de pénétration des hyphes dans les tissus ont pu être vérifiés.

Les problèmes de coloration des coupes et de visualisation en microscopie confocale à balayage laser devraient pouvoir être contournés en utilisant des souches de champignon marquées constitutivement. L'obtention de ces souches permettrait ainsi de réaliser des contaminations artificielles et naturelles de graines d'*A. thaliana* qui serviraient alors de matériel biologique pour les coupes au cryostat. La visualisation du champignon dans les tissus de la graine devrait alors être possible en microscopie confocale à balayage laser sans coloration préalable. Afin d'améliorer la visualisation et la qualité des images obtenues, les tissus de la graine pourront être colorés avec de l'iodure de propidium selon le protocole établi par S. Pochon (2012).

Enfin, ce stage m'a permis de travailler avec des techniques d'histologie (coupes au cryostat) et de microscopie (microscopie classique, en fluorescence) et d'acquérir des compétences et des connaissances reliées au domaine de la pathologie végétale. J'aurais cependant aimé avoir plus de temps pour réaliser des tests avec des souches marquées et obtenir plus d'informations sur la localisation du champignon en microscopie confocale.

7. Bibliographie

7.1. Ouvrages et articles de revues scientifiques

Agarwal VK, Sinclair JB. 1996. *Principles of Seed Pathology. CRC Press LLC*.

Bessadat N, Simoneau P, Benichou S, Setti B, Kihal M, Henni Djamel E. 2014. Morphological, physiological and pathogenic variability of small-spore Alternaria sp. causing leaf blight of Solanaceous plants in Algeria. African Journal of Microbiology Research **8(37)**, 3422–3434.

Bewley J. 1997. Seed Germination and Dormancy. The Plant Cell **9(7)**, 1055–1066.

Bonman JM, Gabrielson PH. 1981. Localized infections of siliques and seed of cabbage by Phoma lingam. Plant disease **65**, 868–869.

Bove J, Jullien M, Grappin P. 2002. Functional genomics in the study of seed germination. Genome Biology **3(1)**, REVIEWS1002.

Calmes B. 2011. Réponses adaptatives d'Alternaria brassicicola au stress oxydatif lors de l'interaction avec les Brassicacées. Thèse de doctorat en Biologie Cellulaire et Moléculaire Végétale, Université d'Angers. 130p.

Guillemette T, Calmes B, Simoneau P. 2014. Impact of the UPR on the virulence of the plant fungal pathogen A. brassicicola. Virulence **5(2)**, 357–364.

Hoch HC, Galvani CD, Szarowski DH, Turner JN. 2005. Two new fluorescent dyes applicable for visualization of fungal cell walls. Mycologia **97 (3)**, 580–588.

Iacomi-Vasilescu B, Blancard D, Guenard M, Molinero-Demilly V, Laurent E, Simoneau P. 2002. Development of a PCR-based diagnostic assay for detecting pathogenrc Alternaria species in cruciferous seeds. Seed Science and Technology **30 (1)**, 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. Thèse de doctorat en Biologie Cellulaire et Moléculaire Végétale, Université d'Angers. 180p.

Knox-Davies PS. 1979. Relationships between Alternaria brassicicola and Brassica seeds. Transactions of the British Mycological Society **73**, 235–248.

Kohl J, Van Der Wolf J. 2005. Alternaria brassicicola and Xanthomonas campestris pv. campestris in organic seed production of Brassicae : epidemiology and seed infection. Plant Research International.

Kohl J, Van Tongeren C a. M, Groenenboom-De-Haas BH, Van Hoof RA, Driessen R, Van Der Heijden L. 2010. Epidemiology of dark leaf spot caused by Alternaria brassicicola and A. brassicae in organic seed production of cauliflower. Plant Pathology **59**, 358–367.

Lawrence CB, Mitchell T, Craven KD, Kim K-H. 2008. At Death's Door: Alternaria Pathogenicity Mechanisms. Plant Pathol **24**, 101–111.

Maude RB. 1996. *Seedborne Diseases and Their Control: Principles and Practice*. CAB International. 312p.

Maude RB, Humpherson-Jones FM. 1980. Studies on the seed-borne phases of dark leaf spot Alternaria brassicicola and grey leaf spot Alternaria brassicaeof brassicas. Annals of Applied Biology **95**, 311–319.

McKhann HI, Camilleri C, Bérard A, Bataillon T, David JL, Reboud X, Le Corre V, Caloustian C, Gut IG, Brunel D. 2004. Nested core collections maximizing genetic diversity in Arabidopsis thaliana. The Plant Journal: For Cell and Molecular Biology **38(1)**, 193–202.

Mukherjee AK, Lev S, Gepstein S, Horwitz BA. 2009. A compatible interaction of Alternaria brassicicola with Arabidopsis thalianaecotype DiG: evidence for a specific transcriptional signature. BMC Plant Biology **9**, 31.

N'Guyen G. 2016. Etudes des déterminants moléculaires impliqués dans la capacité de transmission d'Alternaria brassicicola aux semences d'Arabidopsis thaliana. Thèse de doctorat en Biologie Cellulaire et Moléculaire Végétale, Université d'Angers. 275p.

Otani H, Kohnobe A, Narita M, Shiomi H, Kodama M, Kohmoto K. 2001. A new type of host-selective toxin, a protein from Alternaria brassicicola. In: KEEN NT, MAYAMA S, LEACH J.E, TSUYUMU S, (cds). Delivery and perception of pathogen signals in plants. American Phytopathological Society, 68–76.

Pochon S. 2012. Etudes des mécanismes moléculaires impliqués dans la transmission des agents pathogènes aux semences d'Arabidopsis thaliana. Thèse de doctorat en Biologie Cellulaire et Moléculaire Végétale, Université d'Angers. 180p.

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 (10)**, 16.

Schenk PM, Kazan K, Manners JM, Anderson JP, Simpson RS, Wilson IW, Somerville SC, Maclean DJ. 2003. Systemic Gene Expression in Arabidopsis during an Incompatible Interaction with Alternaria brassicicola. Plant Physiology **132 (2)**, 999–1010.

Singh D, Mathur SB. 2004. *Histopathology of Seed-Borne Infections. 296p.*

Thomma BPHJ. 2003. Alternaria spp.: from general saprophyte to specific parasite. Molecular Plant Pathology **4 (4)**, 225–236.

Wolf WJ, Baker F., Bernard J. 1981. Soybeen seed-coat structural features: pits, deposits and cracks. Scanning Electron Microscopy III, 531–544.

7.2. Sources internet

[1] **IRHS (2016).** *L'institut de Recherche en Horticulture et Semences – Organigramme de l'IRHS*. https://www6.angers-nantes.inra.fr/irhs/L-Institut (Consulté le 15/05/2017).

[2] **IRHS (2013).** *L'institut – Les pôles de recherche*. http://www6.angers-nantes.inra.fr/irhs/L-Institut/Les-poles-de-recherche (Consulté le 15/05/2017).

[3] **SFR QUASAV (2017).** *SFR : Présentation de la SFR*. https://www.sfrquasav-angers.org/Presentation-de-la-SFR-Quasav (Consulté le 15/05/2017).

[4] **MYCOTA.** *Alternaria – MYCOTA : Les contaminants fongiques du patrimoine culturel*. http://mycota-crcc.mnhn.fr/site/genreDetail.php?num=2&n=Alternaria (Consulté le 15/05/2017).

RÉSUMÉ

La maladie des taches noires, causée par le champignon nécrotrophe *Alternaria brassicicola*, est responsable de pertes de rendement chez les Brassicacées cultivées (chou, colza, moutarde). La transmission à et par les semences est une étape cruciale du cycle de développement de ce champignon. Cette étape de transmission est étudiée dans l'équipe FungiSem *via* le pathosystème modèle *Alternaria brassicicola* / *Arabidopsis thaliana*. Les études antérieures en microscopie ont montré la présence d'un mycélium entourant les graines ainsi que des points de pénétration. Néanmoins, l'impact et la localisation en profondeur du mycète dans les tissus sont peu étudiés. Nous avons travaillé à la mise au point d'un mode opératoire permettant d'obtenir des coupes fines de graines *d'A. thaliana,* contaminées par une souche pathogène (Abra43) ou par une souche saprophyte (*Alternata* 42) *à* différents stades de développement. La réalisation des coupes est un réel challenge technique du fait de la fragilité des tissus de la graine.

Des coupes de bonne qualité ont pu être obtenues mais les étapes ultérieures d'analyses (notamment la coloration fongique) ont porté atteinte à leur intégrité. Nous proposons de nous affranchir de cette étape par l'utilisation de souches marquées constitutivement par des protéines fluorescentes. Grâce à l'obtention de ces coupes fines couplée à une observation en microscopie confocale à balayage laser, nous espérons améliorer les connaissances sur la localisation du champignon dans les tissus de la graine.

mots-clés : semences, agents pathogènes, microscopie, *Alternaria brassicicola*, *Arabidopsis thaliana*

ABSTRACT

The black spot disease, due to *Alternaria brassicicola*, a necrotrophic fungus, is a disease inducing economic problems on cultivated Brassicaceae (cabbage, rapeseed, mustard). Transmission to and by the seeds is a crucial step in the development cycle of this fungus. This stage of transmission is studied in the FungiSem team and is based on the *Alternaria brassicicola* / *Arabidopsis* pathosystem. Previous studies in microscopy have shown the presence of a mycelium surrounding the seeds as well as penetration points. However, the impact and the deep location in the tissues is under-studied. We have worked on the development of procedure for obtaining thin sections of *A. thaliana* seeds, contaminated with a pathogenic strain (Abra43) or with a saprophytic strain (Alternata 42), at different stages of development. The realization of the cuts is a technical challenge due to the fragility of seed tissues.

High quality sections have been obtained but further analysis steps (especially staining step) have undermined their integrity. We propose to overcome this step by using strain marked by fluorescent proteins.

Thanks to the obtaining of this thin sections linked with an observation in confocal laser scanning microscopy we hope to improve the knowledge on fungi location in seed tissues.

keywords : seeds, pathogenic agent , microscopy, *Alternaria brassicicola*, *Arabidopsis thaliana*

Présidence de l'université
40 rue de rennes – BP 73532
49035 Angers cedex
Tél. 02 41 96 23 23 | Fax 02 41 96 23 00