



Master "Biologie Végétale" co-accrédité : Université
d'Angers, de Nantes, et Agrocampus Ouest

Institut Jean-Pierre Bourgin
UMR 1318 INRA-AgroParisTech



RAPPORT de STAGE EFFECTUE

par

Kévin FLOCH

au

Laboratoire d'Interaction Azote-Pathogènes (NPI)
Pôle Adaptation des Plantes à l'Environnement (APE)

Institut Jean-Pierre Bourgin (IJPB)
UMR 1318 INRA-AgroParisTech

en vue de l'obtention du

Master Biologie Végétale

Parcours : Semences et Plants

(Responsables de stage : Marie-Christine Soulié, Maître de conférences Paris VI & Mathilde Fagard,
Directeur de Recherche)

Sujet :

**CARACTERISATION DE MUTANTS AU COURS DE L'INTERACTION
ARABIDOPSIS-BOTRYTIS EN FONCTION DE LA NATURE DE LA SOURCE
AZOTEE (NO_3^- OU NH_4^+)**

Soutenance devant le jury d'examen le 15 Juin 2018



UNIVERSITÉ DE NANTES

ENGAGEMENT DE NON PLAGGIAT

Je, soussigné, Kévin FLOCH déclare être pleinement conscient que le plagiat de documents ou d'une partie d'un document publiés 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.

Signature :

Fait à Versailles le 4 Juin 2018

Remerciements

Tout d'abord, je tiens à remercier mon tuteur de stage P. Poupard pour son accompagnement, les membres du jury qui étudieront ce rapport de stage ainsi que les responsables du Master « Biologie Végétale » de l'Université d'Angers et Agrocampus Ouest.

Je vais commencer par remercier Marie-Christine Soulié et Mathilde Fagard, j'avais hâte de vous rejoindre dans l'équipe « Interaction Azote-Pathogènes » (*Nitrogen-Pathogen Interaction*) depuis le jour de notre rencontre en septembre dernier, il est rare de finir par parler de chocolat et gâteaux à la fin d'un entretien. Vous avez su m'accueillir avec beaucoup d'enthousiasme, de gentillesse et de bienveillance. Dès le début je savais que ce serait une superbe expérience de pouvoir travailler avec vous deux, j'ai réellement apprécié cela. *The binôme de choc* ! Vous m'avez transmis bien plus que de la connaissance, une manière d'aborder les choses différemment, avec plus d'originalité.

Marie-Christine, nous avons réussi à dompter nos mutants de *B. cinerea*. Mathilde, j'ai quand même amélioré mon semis d'*A. thaliana*, vive le semis en diagonale ! Merci Hervé Ferry, notre Basque, pour t'être si bien occupé de nos plantes. Merci Luc Bachelet pour avoir stérilisé tous mes mortiers pour les extractions d'ARN. Un grand merci Martine Rigault pour les qPCR, tu m'as sauvé la vie avec ta formule magique.

Un grand merci à toute l'équipe NPI. J'ai passé mes six mois de stage dans le bureau RC-3, centre névralgique du chocolat et de la pause-café avec les thésards et autres stagiaires. Merci Martine, Sylvie Jolivet et Marlène Bailly pour tous ces bons moments. Martine, nous les avons faits, les 51 kms de la Marche de la Bièvre, le retour a été mémorable dans les métros parisiens ! Le café après le repas me manquera, qu'est-ce que l'on a rigolé.

Je n'oublie pas tous les échanges que j'ai eus avec les membres du bâtiment 3, je vous remercie pour votre bonne humeur et tous les événements que nous avons partagé ensemble à l'IJPB ou à Versailles. On se serre les coudes entre membres du Bât 3. Merci Fabienne Soulay pour m'avoir cuisiné de merveilleux plats, c'était un délice. J'ai hâte de voir ce que donnera notre jardin partagé à mon départ, en espérant revenir.

Je vais clôturer ces remerciements par les membres non-permanents (thésards, stagiaires...). Merci Camille Verly pour tes remarques constructives et le concert du Rat sur la Corde. Un grand merci à Emilie Aubry et Mathilde Gregoire, j'ai eu de nombreuses discussions intéressantes avec vous pour me préparer au concours de thèse, notre bar-traquenard me manquera, nous avons passé de très bonnes soirées ensemble. Merci Servane Bigot pour ta présence et tes chansons, on se soutient entre stagiaires M2 de l'ouest !

Un grand merci à tous pour tous ces moments, j'ai passé un stage que je ne suis pas prêt d'oublier.

Abréviations

- α : risque de première espèce (statistiques)
- σ : écart type (statistiques)
- °C : degré Celsius
- % : pourcent
- μg : microgramme
- μL : microlitre
- μM : micromolaire
- *ACPI* : ACid Protease 1
- *ACTINE* : Composant du cytosquelette
- ADNc : Acide DésoxyriboNucléique complémentaire
- *APT* : Adenin Phosphoribosyl Transferase
- ARN : Acide RiboNucléique
- ARNm : Acide RiboNucléique messenger
- *BOA6* : BOtcinic Acid 1
- *BOT2* : BOTrydial 2
- cm^2 : centimètre carré
- DNase : DésoxyriboNucléAse
- DO : Densité Optique
- dt : désoxythymine
- g : gramme
- G : grossissement à la loupe binoculaire
- H_0 : hypothèse nulle (statistiques)
- h : heure
- H_2O : molécule d'eau
- HATS : *High affinity transport system* (système de transport du nitrate à haute affinité)
- hpi : heures post infection
- J : jour
- kg : kilogramme
- LATS : *Low affinity transport system* (système de transport du nitrate à faible affinité)
- MF : matière fraîche
- mg : milligramme
- min : minute
- mL : millilitre
- mm : millimètre
- mM : millimolaire
- m/v : concentration massique
- MS : Métabolite Secondaire
- NaNO_3^- : nitrate de sodium
- NH_4^+ : ion ammonium
- $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$: ion sulfate d'ammonium
- nm : nanomètre
- NO_3^- : ion nitrate
- NPI : *Nitrogen-Pathogen Interactions* (Interactions Azote-Pathogènes)
- PCR : *Polymerase Chain Reaction* (Amplification par Polymérase en Chaîne)
- *PDF1.2a* : Plant DeFensin 1.2a
- *PG1* : PolyGalacturonase 1
- *PGIP1* : PolyGalacturonase Inhibiting Protein 1
- *PGIP2* : PolyGalacturonase Inhibiting Protein 2
- pH : potentiel hydrogène

- *PME17* : Pectin MethylEsterase 17
- *PR1* : Pathogen Recognition 1
- qPCR : PCR quantitative
- ROS : *Reactive Oxygen Species* (Espèces réactives de l'oxygène)
- rcf : *relative centrifugal force* (force centrifuge relative)
- rpm : rotations par minute
- SAR : *Systemic Acquired Resistance* (Réponse systémique acquise)
- SD : erreur standard (Standard Deviation)
- sg : surnageant
- TE : Tris EDTA
- V : Volt
- W : Watt
- X : facteur de dilution

Table des matières

I.	Introduction bibliographique	2
II.	Matériels et méthodes	7
A.	Matériel végétal	7
B.	Matériel fongique	7
C.	Méthodes utilisées	8
III.	Résultats	12
A.	Etat physiologique de la plante	12
B.	Pouvoir pathogène	12
C.	Observation des infections à la loupe binoculaire	13
A.	Etude de l'expression des gènes dans les tissus foliaires	14
IV.	Discussion	16
V.	Conclusions et perspectives	20
VI.	Références bibliographiques	22
A.	Articles scientifiques :	22
B.	Sites internet :	24
VII.	Annexes	25

I. Introduction bibliographique

Après la fin de la seconde guerre mondiale, et plus précisément entre les années 1960 et 1990, les progrès techniques et technologiques ont permis d'importantes avancées profitant au développement de l'agriculture intensive. C'est d'une volonté politique et industrielle que découle la révolution verte, basée sur la sélection de variétés de plantes à haut rendement, une irrigation adaptée et l'utilisation d'intrants (engrais et produits agropharmaceutiques). L'optimisation et l'augmentation des rendements dépend en partie des apports nutritifs que l'agriculteur fournit aux cultures. L'azote est l'un des trois macro éléments essentiels au développement des végétaux. Il représente 2 % du poids sec chez la plante (Patterson *et al.*, 2010) et est un composant structurel des protéines, acides nucléiques et métabolites secondaires (Miller and Cramer, 2005). L'azote est essentiellement utilisé comme intrant sous deux formes, le nitrate (NO_3^-) et l'ammonium (NH_4^+) apportés seuls ou combinés. Entre 1960 et 1995, l'utilisation globale de l'azote a été multipliée par 7. Pourtant, la production de céréales dans le monde a seulement doublé (Tilman *et al.*, 2002). En effet, la plante n'assimile pas la totalité des nutriments et une grande partie peut être lessivée dans les sols entraînant ainsi une perte de 50 % à plus de 75 % de ces engrais (Raun and Johnson, 1999). Ces pertes ont non seulement un impact économique pour les utilisateurs d'intrants, mais ont aussi un impact écologique non négligeable. Cet azote lessivé dans les sols se retrouve dans les nappes phréatiques et entre dans le cycle de l'eau. Cette eau polluée finit par arriver au niveau des zones côtières occasionnant une eutrophisation des écosystèmes et favorisant la prolifération des algues.

L'azote présent dans le sol ou apporté *via* les fertilisants sous forme de nitrate et d'ammonium est absorbé par la plante au niveau de son système racinaire grâce à différents transporteurs. L'utilisation de l'ammonium est cependant limitée car cette source d'azote peut être toxique. Les plantes assimilent préférentiellement le nitrate à l'aide de transporteurs à haute affinité (HATS) ou à faible affinité (LATS). L'ammonium est absorbé par la plante à l'aide des transporteurs AMT1. Lorsque le nitrate est assimilé, celui-ci est réduit en nitrite par la nitrate réductase cytosolique, puis réduit en ammonium par la nitrite réductase chloroplastique. L'ammonium est ensuite transformé en glutamine par la glutamine synthétase plastidiale (GS2) puis en glutamate par la glutamine oxoglutarate amino transférase ou glutamate synthétase (GOGAT). Le glutamate permet ainsi la synthèse d'acides aminés, protéines, nucléotides, chlorophylles, hormones et d'autres composés essentiels à la croissance, au développement ainsi qu'à la survie de la plante dans son environnement (Snoeijers *et al.*, 2000).

La nutrition azotée ayant un impact sur la physiologie de la plante, celle-ci peut aussi favoriser ou empêcher l'infection par un agent phytopathogène, et ainsi modifier la sévérité des maladies (Snoeijers *et al.*, 2000 ; Fagard *et al.*, 2014). D'autre part, l'effet est non seulement dépendant de l'interaction plante-hôte étudiée (Dordas, 2009), mais aussi de la concentration utilisée en azote (Ballini *et al.*, 2013).



Figure 1 : Symptômes typiques de Botrytis cinerea sur framboises (A) (d'après de Williamson et al. 2007), sur vigne (B) (Wikimedia Commons), sur tomate (C) (AgriMaroc.ma), sur fraise (D) (Wikimedia Commons). Symptômes de macérations sur feuilles d'Arabidopsis thaliana avec la souche B0510 obtenues dans nos tests de pouvoir pathogène à 3 jours post infection (E)

Par exemple chez la tomate (*Solanum lycopersicum*) une forte concentration en nitrate peut soit favoriser le développement de la maladie avec *Oidium lycopersicum* soit limiter le développement de *Botrytis cinerea* (Walters and Bingham, 2007). Généralement les agents pathogènes biotrophes sont connus pour se développer plus facilement sur les plantes avec une teneur en azote élevée. *A contrario*, les micro-organismes nécrotrophes se développent généralement mieux en teneur azotée faible. Toutefois, pour un même agent pathogène, tel que *B. cinerea*, la teneur en azote peut avoir un effet différent selon l'hôte infecté (Fagard *et al.*, 2014).

Botrytis cinerea est l'agent causal de la maladie appelée pourriture grise (ou pourriture noble dans un cas précis). Ce champignon Ascomycète, découvert en 1729 et décrit en 1794 par Christian Persoon, fait partie de la famille des *Sclerotiniaceae* (Staats *et al.*, 2005). La forme asexuée, nommée *B. cinerea*, est la plus fréquente. Sous sa forme sexuée, rare dans la nature, il porte le nom de *Botryotinia fuckeliana* (de Bary). C'est un champignon nécrotrophe, c'est-à-dire qu'il tue les cellules de la plante pour se développer, et possède un arsenal d'infection large et diversifié (enzymes pectinolytiques, toxines, ROS) lui permettant d'être un agent pathogène polyphage sur plus de 250 espèces végétales. Il est capable d'infecter les cultures à presque n'importe quel stade pendant la croissance ou le stockage et peut affecter de multiples parties de la plante comme les cotylédons, feuilles, tiges, fleurs, fruits et racines (Figure 1) (Williamson *et al.*, 2007). Du fait de cette large gamme d'hôte et de son infection rapide, il est classé comme le deuxième champignon ayant un impact économique et scientifique majeur (Dean *et al.*, 2012). L'estimation des pertes causées par *B. cinerea* n'est pas simple, mais il est connu que l'achat de produits agropharmaceutiques pour traiter les cultures contre ce champignon représente 10 % des fongicides dans le monde, dont 50 % sont utilisés pour les vignobles et les productions de raisin de table. L'utilisation de ces fongicides permet de contrôler le développement des populations fongiques sur les cultures mais à long terme ils provoquent l'apparition de souches résistantes à ces molécules antifongiques (Leroux *et al.*, 2002; Leroch *et al.*, 2011). Lors de l'infection, *B. cinerea* envahit les tissus de la plante hôte et provoque une macération tissulaire du fait de la sécrétion d'enzymes pectinolytiques. Il finit par produire des conidiophores, produisant des spores appelées macroconidies (multiplication asexuée). Les contaminations par ce champignon filamenteux se font soit par le mycélium présent dans les résidus de cultures précédentes, soit par les macroconidies dispersées par la pluie ou le vent (Williamson *et al.*, 2007). Le développement est toutefois plus rapide avec le mycélium qui va mettre en place une structure globulaire appelée *claw-like* formée par un agrégat cellulaire (Choquer *et al.*, 2007).

Afin de pénétrer dans les tissus de l'hôte, *B. cinerea* applique une forte pression osmotique à l'aide d'appressoria, produit des ROS et sécrète des enzymes de dégradation des polysaccharides, appelées *Carbohydrate-Active enZymes* (CAZymes), permettant la dégradation de la paroi. A cela s'ajoute des toxines non spécifiques telles que le botrydial ou l'acide botcinique qui provoquent la mort cellulaire et favorisent la pénétration dans les tissus de l'hôte (Choquer *et al.*, 2007). C'est en 2011 qu'a été effectué le

séquençage du génome de *Botrytis* (génotype B0510) (Amselem *et al.*, 2011) permettant ainsi des études moléculaires plus approfondies. Blanco-Ulate et ses collaborateurs (2014) ont mis en évidence, à l'aide d'une analyse transcriptomique faite sur feuilles de laitue infectées par *B. cinerea*, que 1155 gènes codant pour des CAZymes, sont potentiellement à l'origine des macérations tissulaires.

Les plantes doivent faire face aux stress abiotiques et biotiques au cours de leur cycle de vie. Au contact d'autres organismes, elles déclenchent différentes réactions de défense. Ces défenses sont soit passives soit inductibles. La défense passive regroupe un ensemble de moyens structuraux ou chimiques mis en place de manière permanente chez la plante (Piasecka *et al.*, 2015). Une grande partie des agents pathogènes sont bloqués par ces défenses *via* des barrières physiques telle que la cuticule ou des barrières chimiques avec la présence de certaines molécules anti-microbiennes dans les tissus (phénols). Suite à différentes études concernant la localisation de ces composés liés à la défense passive, il a été montré qu'elle variait selon le type d'organe, de tissus et de leur âge. Certains agents pathogènes ont évolué de manière à contourner ces défenses soit en les bloquant (défenses inductibles) avant leur déclenchement comme le font certains organismes symbiotique (Wang *et al.*, 2012).

Les défenses inductibles sont enclenchées après la détection d'une infection par un organisme étranger à la plante (Wu *et al.*, 2014). La première chose qui permet la détection d'organismes étrangers sont les motifs moléculaires associés aux microbes ou pathogènes (MAMPs/PAMPs) (Hahlbrock *et al.*, 2003; Mazzotta and Kemmerling, 2011). A cela s'ajoute les DAMPs (Damage-associated molecular patterns) qui, comme les oligogalacturonides (OGs), sont produits lors de la dégradation des parois des tissus de l'hôte. Les récepteurs qui permettent la détection de ces molécules sont des récepteurs de reconnaissance de motifs appelés aussi les *Pattern Recognition Receptor* (PRR). Ils induisent ainsi les premières réactions de défense avec la synthèse de composés moléculaires néfastes pour les agents pathogènes ou une modification structurale pour limiter leur propagation (nécroses des cellules infectées et environnantes, formation de callose). Ces réactions sont nommées Pamp/Mamp Triggerd Immunity (PTI/MTI). Par exemple, la flagelline, protéine composant le flagelle bactérien est reconnu par son domaine riche en leucine (Leucin Rich Receptor – LRR). Une cascade de kinases est ensuite enclenchée, produisant ainsi des protéines impliquées dans la défense, un burst oxydatif (ROS) pour limiter la propagation de l'agent pathogène (Gómez-Gómez and Boller, 2002; Wyrsh *et al.*, 2015). Ces mécanismes de défense sont généralement induits par des voies hormonales. Dans le cas des organismes biotrophes, il est reconnu que la voie de l'acide salicylique (SA) est impliquée. Pour les nécrotrophes c'est plutôt l'acide jasmonique (JA) et l'éthylène (ET) qui sont impliqués (Glazebrook, 2005).

L'implication du métabolisme azoté dans la résistance des plantes face aux agents pathogènes est mal connue pour le moment. Cependant, il est connu que l'infection par des organismes pathogènes comme *B. cinerea* est impactée par la nutrition azotée de la plante (Fagard *et al.*, 2014; Vega *et al.*, 2015). Une

augmentation des symptômes provoqués par *B. cinerea* a été observée sur fraise, vigne ou *A. thaliana* lors d'une forte nutrition azotée. Cependant le phénomène est inversé pour la culture de tomate où les symptômes sont plus importants pour les plantes cultivées en faible azote (Lecompte *et al.*, 2010 ; Vega *et al.*, 2015). Les processus permettant d'expliquer l'impact de la nutrition azotée sur le processus infectieux ne sont pas encore bien décrits mais les données de la littérature suggèrent que la nutrition azotée pourrait affecter trois aspects des interactions : la nutrition de l'agent pathogène *in planta*, l'expression des défenses de la plante et l'expression des facteurs de virulence de l'agent pathogène. Par exemple, lors d'une infection de plants de tournesols par *B. cinerea*, Dulermo et ses collaborateurs (2009) ont montré une diminution de la teneur en asparagine, aspartate, glutamate et glutamine dans les tissus infectés comparativement aux tissus sains. Ce champignon nécrotrophe utilise donc ces acides aminés pour son développement au détriment de la plante hôte (Dulermo *et al.*, 2009) Par ailleurs, des modifications d'expression de nombreux gènes chez la tomate lors de ce multi-stress, ont été observées et ont permis de montrer un lien entre la nutrition azotée et les défenses de la plante liées aux voies de l'éthylène et de l'acide jasmonique (Vega *et al.*, 2015 ; Blanco-Ulate *et al.*, 2014). Enfin, il est connu que l'expression des gènes codant pour les facteurs de virulence de certains agents pathogènes sont affectés par la teneur en azote dans le milieu (Wei *et al.*, 1992).

Dans la plupart des cas, les analyses transcriptomiques que l'on peut trouver dans la littérature concernent soit l'impact d'un stress abiotique, comme la limitation en azote, soit l'impact d'un stress biotique mais permettent rarement d'étudier les deux (abiotique et biotique). De plus, les chercheurs analysent généralement les profils de gènes d'un seul génome lors d'interaction biotique. Mon équipe d'accueil a réalisé une analyse transcriptomique à temps précoce (6 hpi) sur tissus foliaires d'*A. thaliana* cultivés à faible ou fort nitrate puis infectés par *B. cinerea*, cette analyse s'est focalisée sur les génomes des deux protagonistes (Soulié *et al.*, en préparation). A l'issue de ces analyses, des gènes de plante et de champignon différenciellement exprimés en fonction de la quantité de nitrate disponible au cours de la culture des plantes ont été sélectionnés. Pour *A. thaliana* 182 gènes sont concernés par ce changement d'expression, quant à *B. cinerea*, ils sont au nombre de 22. L'étude de ces gènes d'intérêt pourra permettre de mieux comprendre l'impact du nitrate sur leur expression et à terme d'identifier les mécanismes sous-jacents.

J'ai réalisé mon stage de Master 2 au sein de l'équipe « Interactions Azote-Pathogène » (NPI) dans le pôle Adaptation des Plantes à l'Environnement (APE) de l'Institut Jean-Pierre Bourgin qui est une unité mixte de recherche (UMR 1318) de l'Institut National de Recherche Agronomique (INRA) et AgroParisTech. Mon stage s'insère dans l'étude de stress multiples et a pour objet l'étude de l'impact de la nutrition azotée sur l'interaction *A. thaliana* - *B. cinerea*. Lors de précédents travaux de l'équipe, il a été démontré qu'*A. thaliana* cultivée à faible nitrate (0,5 mM) est plus tolérante à *B. cinerea* que lorsqu'elle est cultivée à fort nitrate (10 mM). De plus, en comparant les plantes cultivées à des concentrations

équivalentes (2 Mm) de nitrate ou d'ammonium, celles-ci sont plus tolérantes à *B. cinerea* en ayant été cultivées en ammonium (Soulié *et al.*, en cours de publication). J'ai donc travaillé sur des plantes cultivées avec ces deux sources d'azote puis infectées avec la souche sauvage de *B. cinerea* et les trois mutants délétés au niveau de gènes sélectionnés lors de l'analyse du transcriptome : un mutant dont le gène (*MS*) codant pour une enzyme qui entre dans la voie de biosynthèse d'un métabolite secondaire a été délété (01745) (Aguileta *et al.*, 2012), un mutant dont le gène (*ACPI*) codant pour une protéase acide putative a été délété (14153) (Rolland and Bruel, 2008) et un mutant dont le gène (*BOT2*) codant pour une enzyme qui entre dans la voie de biosynthèse d'une toxine, appelée botrydial, a été délété (16381) (Dalmais *et al.*, 2011). Ces mutants de *B. cinerea* pourront nous permettre de répondre aux questions suivantes :

- Est-ce que ces gènes sont impliqués dans la virulence de *B. cinerea* ?
- Ces gènes permettent-ils d'expliquer la différence de symptômes lorsque les plantes sont cultivées soit en nitrate soit en ammonium ?
- Les gènes de champignon et de plante s'expriment-ils différemment chez les plantes cultivées sur ammonium comparativement à celles cultivées en nitrate?

Afin d'étudier l'expression des gènes impliqués dans la virulence de *B. cinerea*, nous utilisons le gène de l'*ACTINE* comme référence, c'est un gène du cytosquelette du champignon. D'autre part, on étudie l'expression de différents gènes comme *PGI*, PolyGalacturonase 1, qui code pour une enzyme de dégradation de la paroi des cellules végétales et constitue un facteur de virulence connu de *B. cinerea*. Ainsi que les gènes *MS*, *ACPI*, *BOT2* et le gène *BOA6*, qui code pour une enzyme de la voie de biosynthèse d'une toxine, l'acide botcinique. Concernant l'expression des gènes impliqués dans la défense d'*A. thaliana*, le gène de référence utilisé est le gène *APT*, qui est impliqué dans l'inactivation des cytokinines par phosphorylation ; le gène *PDF1.2a* code pour une défensine et est un gène marqueur de la voie de l'acide jasmonique ; le gène *PME17* code pour une enzyme de défense en réponse aux champignons et bactéries ; le gène *PR1* est un marqueur de la voie de l'acide salicylique et de la réponse systémique acquise qui est généralement induit en réponse aux organismes biotrophes. Les gènes *PGIP1* et *PGIP2* sont des protéines qui inhibent les polygalacturonases du champignon.

J'ai tout d'abord commencé par différentes analyses pour connaître le statut physiologique des tissus foliaires d'*A. thaliana* avant l'infection par le champignon. Nous avons mis en place des tests de pouvoir pathogène et analysé l'évolution des lésions tissulaires provoquées par la souche sauvage B0510 et les mutants de *B. cinerea* sur des plantes d'*A. thaliana* cultivées à 2 mM de nitrate ou d'ammonium. Nous avons complété cette analyse avec des observations des tissus infectés à la loupe après différents temps d'infection. Une analyse de l'expression de quelques gènes impliqués ou non dans la virulence du champignon ainsi que de quelques gènes de défense de la plante a été faite 24h après infection.

II. Matériels et méthodes

A. Matériel végétal

1. Plante modèle

Le projet a porté sur la plante modèle *Arabidopsis thaliana* (*Brassicaceae*) avec le génotype sauvage *Columbia-0* (Col-0). Sa petite taille, son cycle de vie rapide et sa transformation relativement facile en font un modèle de choix en biologie végétale. De plus, l'accès aux banques de données est facile (données génomiques et banques de mutants).

2. Méthode de culture

Les semis sont effectués sur sable et les plantes cultivées en jours courts pendant 6 semaines (photopériode de 8h de jour à 21°C et 16h de nuit à 18°C, hygrométrie relative de 65-70 %). Deux solutions nutritives contenant une faible source d'azote ont été utilisées dès le semis (Annexe 1), l'une étant à 2 mM de nitrate et l'autre à 2 mM d'ammonium.

B. Matériel fongique

1. Champignon modèle et mutants

La souche sauvage B0510 de *B. cinerea* est issue de la souche SAS56 (lignée d'ascospores) collectée sur grappes de raisin dans un vignoble en Italie entre 1985 et 1987. Afin d'obtenir une souche haploïde, le génotype SAS56 a été cultivé sur un milieu contenant un fongicide, le Benomyl® (Büttner *et al.*, 1994). D'autre part, trois mutants de *B. cinerea* ont été utilisés dans cette étude :

- Mutant *ms* : délétion du gène 01745 codant pour une enzyme de la voie de biosynthèse d'un métabolite secondaire.
- Mutant *acp1* : délétion du gène 14153 codant pour une protéase acide.
- Mutant *bot2* : délétion du gène 16381 codant pour une enzyme de la voie de biosynthèse du botrydial, une toxine non spécifique.

2. Milieux de culture

Le milieu Malt Agar ou MA est un milieu de type empirique composé de 1% de malt en poudre diastasique et de 1,2% d'agar bactériologique. Les boîtes de Pétri inoculées avec 10 µL d'une suspension de spores sont placées dans une pièce avec un éclairage permanent (36 w, 2850 Lumens) et une température de 21°C pour une croissance optimale du champignon.

3. Préparation de l'inoculum fongique pour l'infection des feuilles

Après 4 jours de croissance mycélienne, des explants sont découpés au front de croissance du champignon à l'aide d'un emporte-pièce de 3 mm de diamètre (Arbelet *et al.*, 2010).

C. Méthodes utilisées

1. Dosages

a. Dosage de nitrate

Les tissus foliaires sont congelés à l'azote liquide puis finement broyés. La quantification du nitrate est réalisée d'après la technique de Katrina M. Miranda (Miranda *et al.*, 2001). A 20 mg de poudre foliaire sont ajoutés 250 μL d'éthanol à 80 %. Après 10 secondes d'agitation, les échantillons sont laissés dans la glace pendant 1 heure puis centrifugés pendant 20 min à 13200 rpm ou 16100 rcf (4°C). Le surnageant (sg1) est prélevé et transféré dans un nouveau tube. Une nouvelle extraction est faite à partir du premier tube en ajoutant 250 μL d'éthanol à 50 %. Après agitation du tube pendant 10 secondes, les échantillons sont centrifugés pendant 20 min à 13200 rpm ou 16100 rcf (4°C). Le deuxième surnageant (sg2) est additionné au premier (sg1). Une dernière extraction est faite à partir du premier tube en ajoutant 250 μL d'eau stérile et le tube agité pendant 10 secondes. Les échantillons sont centrifugés pendant 20 min à 13200 rpm ou 16100 rcf (4°C). Le surnageant 3 (sg3) est prélevé et ajouté aux précédents surnageants (sg1 et sg2). L'échantillon est prêt à être analysé. En parallèle, une gamme d'étalonnage de NaNO_3^- est réalisée en prélevant 0, 5, 10, 15, 20, 30, 40, 60 μL d'une solution mère de NaNO_3^- à 200 μM . Après avoir complété à 100 μL avec de l'eau distillée, 100 μL du réactif de Miranda (200 mL acide chlorhydrique à 0,5 M, 0,5g de Chlorure de Vanadium, 0,01 g de N-1-naphtyethylenediamine et 0,2 g de sulfanilamide) sont ajoutés à chaque échantillon ainsi que dans la gamme d'étalonnage. Après 6h d'incubation à température ambiante (ou 2h à 60°C) la lecture d'absorbance (DO) est effectuée à 540 nm.

b. Dosage d'ammonium

Les échantillons foliaires sont broyés dans l'azote liquide pour obtenir une poudre fine. A 100 mg de matière fraîche (MF) sont ajoutés 1 mL d'acide sulfosalicylique à 2 % (m/v dans de l'eau). Les échantillons sont centrifugés 5 min à 13200 rpm ou 16100 rcf (4°C). Le surnageant est transféré dans un nouveau tube et conservé dans la glace. En parallèle une solution de sulfate d'ammonium ($(\text{NH}_4^+)_2\text{SO}_4$) à 5 mM est préparée pour la gamme d'étalonnage. Après une dilution au 1/5^{ème} de la solution mère, 0, 10, 20, 30, 40 et 50 μL de la solution sont prélevés et complétés à 50 μL avec de l'eau distillée. Les 50 μL finaux de la gamme d'étalonnage ou des échantillons sont additionnés avec 100 μL d'une solution de phénolate de sodium à 0,33 M (pH 13), 100 μL d'une solution de nitroprussiate de sodium à 0,01 % et 100 μL d'eau de javel à 1,6 %. Après 30 à 40 min d'incubation une lecture d'absorbance (DO) est effectuée au spectrophotomètre à 635 nm.

2. Statut physiologique de la feuille saine

La pince DUALEX® SCIENTIFIC permet de mesurer différentes caractéristiques physiologiques des feuilles. Cet outil développé par ForceA® permet de connaître le contenu surfacique en chlorophylles

($\mu\text{g}/\text{cm}^2$), l'indice des anthocyanes épidermaux et l'indice des flavonols épidermaux. Pour effectuer cette analyse, la pince est placée au centre de la feuille et la mesure est répétée sur trois cultures indépendantes sur plusieurs plantes. Les données sont ensuite extraites de l'appareil et analysées.

3. Coloration au bleu de trypan

L'utilisation de cette coloration a pour but de mettre en évidence les tissus foliaires morts ou stressés. Les feuilles à colorer sont immergées dans une solution de bleu de trypan (20 mg de bleu de trypan dans 120 mL de lactophénol ; lactophénol : 75 mL phénol, 75 mL glycérol, 75 mL acide lactique, 75 mL H_2O stérile et 600 mL d'éthanol absolu) puis incubés 1 min à 100°C . Après une journée et une nuit dans la solution, elles sont rincées à 2-3 reprises avec du chloral hydrate (1 kg pour 400 mL d' H_2O distillée chaude) jusqu'à ce que les feuilles soient transparentes. L'observation peut ensuite être effectuée.

4. Infection des feuilles

Pour effectuer les tests de pouvoir pathogène, les quatre souches de *B. cinerea* sont inoculées sur des feuilles prélevées de plantes d'*A. thaliana* âgées de 6 semaines. Le dépôt de l'explant mycélien se fait au milieu de la face abaxiale des feuilles. Elles sont ensuite déposées dans des boîtes de Pétri contenant des billes de verre et de l'eau stérile afin de garantir une humidité saturante puis incubées sous lumière continue à 21°C . Quotidiennement, les feuilles sont photographiées jusqu'à 2 jours après inoculation (J1 et J2). À l'aide du logiciel ImageJ®, les surfaces des lésions provoquées par le champignon sont mesurées permettant ainsi que quantifier les symptômes (Arbelet *et al.*, 2010).

5. Etude moléculaire

a. Extraction des Acides Ribonucléiques (ARN)

Les échantillons foliaires sont récoltés 24h après infection. Seule la partie macérée de la feuille inoculée sera prélevée ainsi que 2 à 3 mm de tissus adjacent apparemment sain. Les échantillons sont congelés à l'azote liquide puis broyés dans un mortier stérile. À environ l'équivalent de 0,5 mL de poudre sont ajouté 1,25 mL de TRIzol®. Les tubes sont agités, laissés à température ambiante pendant 5 min pour dissocier les ARN des lipides et protéines contenues dans l'échantillon. Les tubes sont centrifugés pendant 10 min à 13200 rpm ou 16100 rcf (5°C) pour séparer les polysaccharides. Le surnageant est transféré dans un nouveau tube auquel on ajoute 250 μL de chloroforme. Après agitation par inversion des tubes, ils sont laissés 5 min à température ambiante puis centrifugés pendant 15 min à 10000 rpm ou 9300 rcf (5°C). La phase supérieure translucide est récupérée dans un nouveau tube puis additionné de 625 μL d'isopropanol. Les tubes sont agités par inversion et laissés 1h dans la glace. Après centrifugation de 10 min à 11000 rpm ou 11200 rcf (5°C) le surnageant est éliminé et le culot lavé avec 1 mL d'éthanol à 70 % froid. Après une centrifugation de 5 min à 8000 rpm ou 5900 rcf (5°C), les culots sont mis à sécher pendant 10 min minimum. Une fois les culots secs, 25 μL de Tris EDTA (TE) sont ajoutés et les tubes placés 10 min au bain marie à

42°C. Les échantillons sont quantifiés au spectrophotomètre SPECTROstar Nano® de BMG LABTECH (2 µL/échantillon).

L'intégrité structurale des ARN est vérifiée grâce à une migration en électrophorèse de chaque échantillon (1 µL d'ARN extraits + 2 µL de tampon de charge + 7 µL d'eau stérile) déposé sur gel d'agarose à 1 %. La migration s'effectue à 75V pendant 30 min.

b. Traitement des ARN par la DNase et transcription inverse (RT-PCR)

Les ARN de chaque échantillon ont été traités avec une DNase pour éliminer les restes d'ADN génomique (2 µg de solution d'ARN, 2 µL de Tampon Buffer 10 X – MgCl₂, 2 µL de solution de DNaseI, RNase free et qsp 20 µL d'eau DEPC). Après addition du tampon de la DNase et de l'eau aux ARN, les tubes sont incubés pendant 45 min à 37°C. Pour mettre fin à la réaction, 2 µL de solution d'EDTA (Thermo Scientific®) sont ajoutés et les échantillons mis à incuber pendant 10 min à 65°C. La transcription inverse permet d'obtenir des ADN complémentaires (ADNc) des ARN extraits. Pour cela, à 2 µg de solution d'ARN ayant subi un traitement à la DNase sont ajoutés 2 µL d'oligonucléotides (dt) (Eurofins Scientific®) et 13 µL d'eau DEPC. La désoxythymine (dt) s'hybride à la queue PolyA des ARNm servant ainsi d'amorce pour permettre la synthèse des ADNc par la transcriptase inverse. Le mélange est incubé pendant 5 min à 65°C pour dissocier les oligos. Après addition de 15 µL de mix à chaque échantillon (8 µL de Tampon Buffer 5 X, 4 µL de dNTPs à 10 mM, 1 µL d'enzyme Ribolock et 2 µL de RevertAid ; Thermo-Fisher Scientific®), une incubation de 60 min à 42°C va permettre l'élongation des brins d'ADNc. Puis une nouvelle incubation de 10 min à 70°C va inactiver l'enzyme. Après avoir ajouté 50 µL d'eau qPCR (eau stérile, distillée, purifiée filtrée à 0,2 µm et sans endotoxines) à chaque échantillon, les ADNc sont quantifiés au spectrophotomètre SPECTROstar Nano®.

c. PCR en temps réel (qPCR)

Afin d'étudier l'expression des gènes liés au pouvoir pathogène de *B. cinerea* (Annexe 2) et des gènes liés à la défense d'*A. thaliana* (Annexe 3), j'ai utilisé la technique de PCR quantitative sur les échantillons d'ADNc. Les gènes choisis proviennent d'une analyse transcriptomique réalisée sur des tissus foliaires de feuilles d'*A. thaliana* Col-0 cultivées à faible ou fort nitrate puis inoculées ou non avec *B. cinerea* (B0510) puis incubés pendant 6h. Ces travaux ont servi de base pour cette étude. L'expression des gènes de champignon (*ACTINE*, *PG1*, *MS*, *ACP1*, *BOT2*, *BOA6*) que ce soit chez la souche sauvage B0510 ou chez les mutants a été analysée lors de l'interaction. En parallèle la même analyse a été faite sur les gènes de défense de la plante (*APT*, *PDF1.2a*, *PME17*, *PR1*, *PGIP1*, *PGIP2*).

Pour quantifier chaque gène dans chaque échantillon foliaire, 3 standards ont été réalisés :

- Standard champignon : issu d'un mélange d'ARN extraits de mycélium de *B. cinerea* cultivé *in vitro* et obtenu par un précédent stagiaire (Shamsuddin Miah Khoka) de l'équipe d'accueil.

- Standard feuilles infectées : issu d'un mélange équimolaire d'ARN de feuilles inoculées par la souche témoin B0510 pour des plantes cultivées à 2 mM de nitrate et 2 mM d'ammonium.
- Standard feuilles témoin : issu d'un mélange équimolaire d'ARN de feuilles non inoculées de plantes cultivées à 2 mM de nitrate et 2 mM d'ammonium.

L'amplification des standards s'est faite à partir de quatre dilutions ($1/5^{\text{ème}}$) consécutives d'ADNc (500 ng/ μ L à 4 ng/ μ L). Concernant les échantillons, l'amplification a été réalisée à partir de deux dilutions, l'une à 500 ng/ μ L et l'autre à 100 ng/ μ L. Dans tous les cas, à 2,5 μ L d'échantillon ou du standard de solution d'ADNc sont ajoutés 7,5 μ L de mix (5 μ L de Sybergreen + 0,15 μ L de l'amorce sens et anti-sens de chaque gène + 2,2 μ L d'eau qPCR). Chaque plaque est mise dans le thermocycleur (BioRad CFX96[®] C1000 Thermal Cycler) et l'amplification se fait selon un programme de cycle précis (Annexe 4). L'expression de chaque gène étudié est normalisée en fonction de deux gènes de référence, *ACTINE* pour les gènes de *B. cinerea* et *APT* pour les gènes d'*A. thaliana*.

6. Test de Wilcoxon-Mann-Whitney

Ce test statistique est plus communément appelé Mann-Whitney, il est non paramétrique et permet de comparer la distribution de deux échantillons indépendants (avec un effectif inférieur à 30) en ordre croissant pour déterminer leur rang. Le risque d'erreur utilisé était $\alpha = 5 \%$. L'hypothèse nulle H_0 indique que les deux échantillons ont la même distribution. Si H_0 est acceptée au risque α , cela signifie que la différence entre les moyennes des deux échantillons est due au côté aléatoire de l'échantillonnage. Si au contraire l'hypothèse H_0 est rejetée avec le même risque, cela signifie que les deux échantillons sont différents.

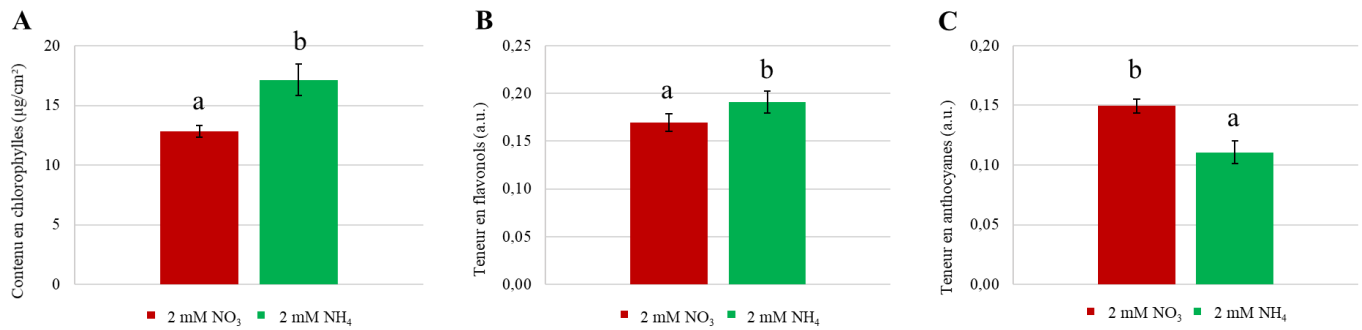


Figure 2 : Quantification des chlorophylles (A), flavonols (B) et anthocyanes (C) dans des feuilles d'*A. thaliana* Col-0 saines. L'expérimentation a été répétée 3 fois sur des cultures indépendantes (test de Mann - Whitney, $P=0,05$). a.u. : unités arbitraires.

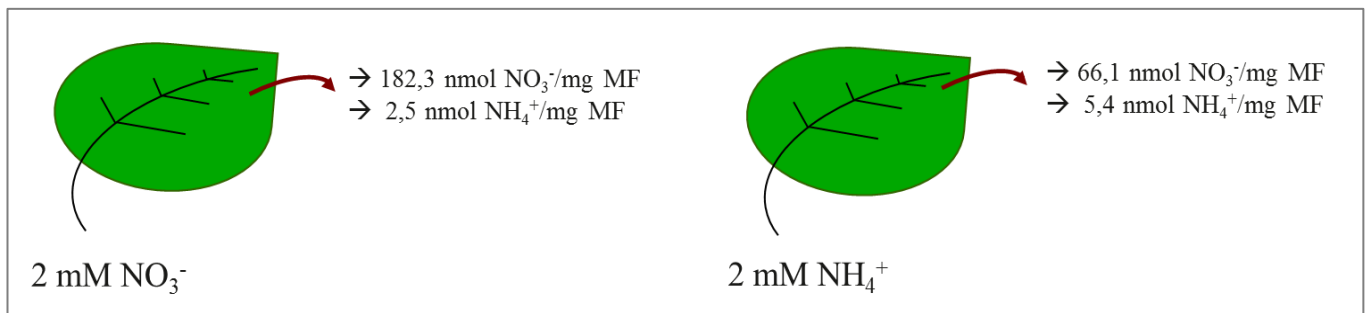


Figure 3 : Quantification du nitrate et de l'ammonium dans des feuilles d'*A. thaliana* Col-0 saines. L'expérimentation a été répétée 3 fois sur des cultures indépendantes.

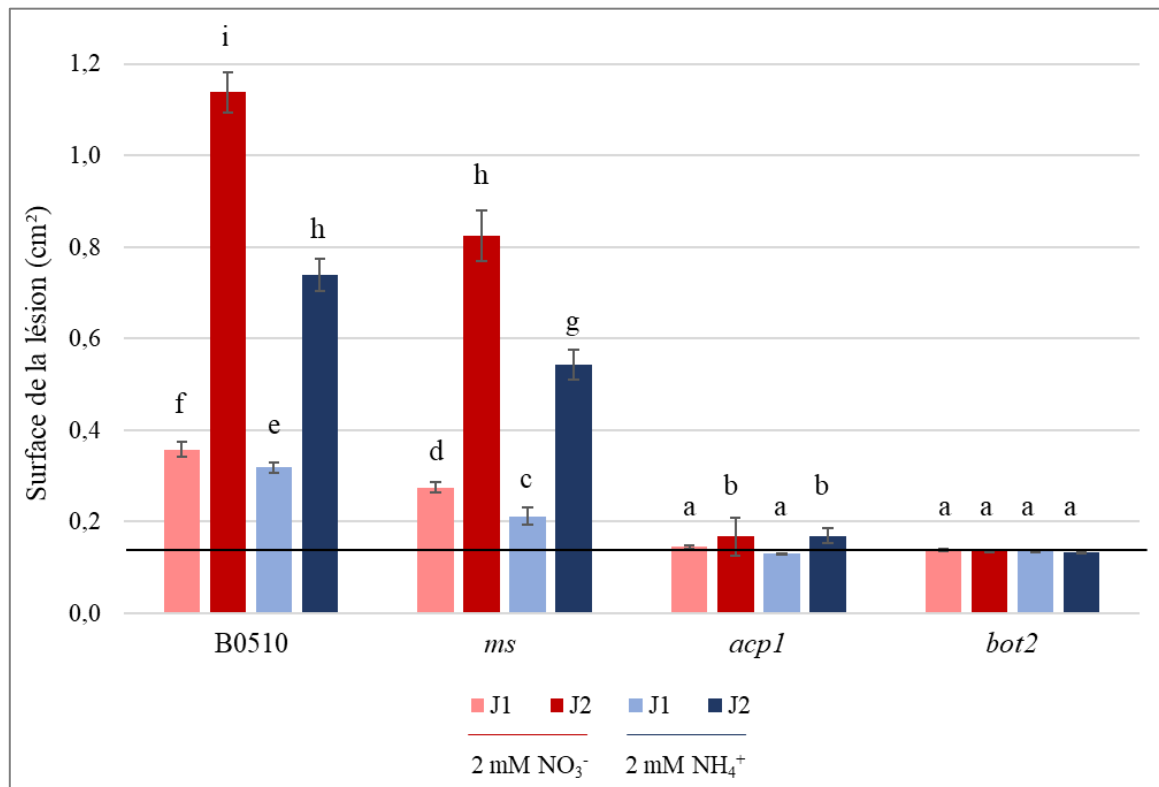


Figure 4 : Test de pathogénicité sur feuilles d'*A. thaliana* Col-0 cultivées à 2 mM de NO₃⁻ ou 2 mM de NH₄⁺, puis inoculées soit avec la souche sauvage B0510, soit avec l'un des 3 mutants (*ms*, *acp1* et *bot2*) de *B. cinerea*. Les surfaces de lésions ont été mesurées quotidiennement pendant 2 jours après infection. Pour chaque condition, trois expérimentations indépendantes ont été faites avec 20 feuilles pour chaque. Les barres d'erreur représentent l'erreur standard. Test de Mann - Whitney ($P = 0,05$).

III. Résultats

A. Etat physiologique de la plante

Afin de mieux appréhender l'impact de la nutrition azotée sur les feuilles d'*A. thaliana* avant infection, plusieurs dosages ont été entrepris :

- Quantification des chlorophylles, anthocyanes et flavonols
- Quantification du nitrate et de l'ammonium

L'ensemble des dosages a été réalisé sur des feuilles d'*A. thaliana* Col-0 saines âgées de 6 semaines et cultivées soit sur 2 mM de nitrate soit sur 2 mM d'ammonium.

1. Quantification des chlorophylles, anthocyanes et flavonols

L'utilisation de la pince DUALEX® nous a permis de connaître rapidement les teneurs en chlorophylles (Figure 2 A), en flavonols (Figure 2 B) et en anthocyanes (Figure 2 C) dans les feuilles saines. Lorsque les plantes sont cultivées à 2 mM d'ammonium les teneurs en chlorophylles et en flavonols sont plus importantes que dans les plantes cultivées à 2 mM de nitrate avec une augmentation de 25 % et 11 % respectivement. *A contrario* pour les anthocyanes, la teneur est plus importante pour les plantes cultivées à 2 mM de nitrate, avec une réduction de 27 % lorsque la source d'azote est l'ammonium. On peut donc conclure que le nitrate semble augmenter la teneur d'anthocyanes alors que l'ammonium quant à lui paraît augmenter les teneurs en chlorophylles et en flavonols. Les plantes cultivées avec l'ammonium comme source d'azote pourraient être plus résistantes face à un agent pathogène du fait d'une plus grande quantité de flavonols qui entrent dans la composition de molécules de défense de la plante.

2. Quantification du nitrate et de l'ammonium

Le dosage de nitrate de plantes cultivées à 2 mM de nitrate a permis de quantifier (Figure 3) dans les tissus foliaires 182,3 nmol/mg de MF (σ : +/- 2,4) de nitrate et 2,5 nmol/mg de MF (σ : +/- 0,02) d'ammonium. Pour les plantes cultivées à 2 mM d'ammonium, la concentration en nitrate est de 66,1 nmol/mg de MF (σ : +/- 5,2) et celle de l'ammonium est de 5,4 nmol/mg de MF (σ : +/- 0,02). Cette quantification nous a permis de faire un point sur les quantités de nitrate et d'ammonium présentes dans les plantes saines selon la source d'azote apportée.

B. Pouvoir pathogène

Les feuilles d'*A. thaliana* cultivées à 2 mM de nitrate ou d'ammonium ont été infectées soit par la souche sauvage B0510 soit par l'une des trois souches mutantes *ms*, *acp1* ou *bot2*. L'évolution des symptômes a été suivie pendant 48 heures en prenant quotidiennement des photographies des feuilles d'*A. thaliana*. Sur le graphique, la ligne noire matérialise la surface des explants déposés sur les feuilles ce qui permet de montrer si il y a développement ou non de la souche (Figure 4).



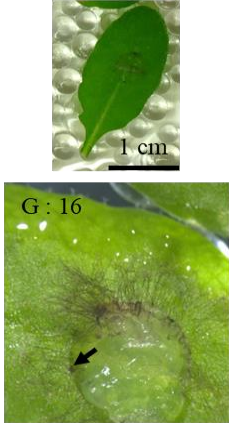
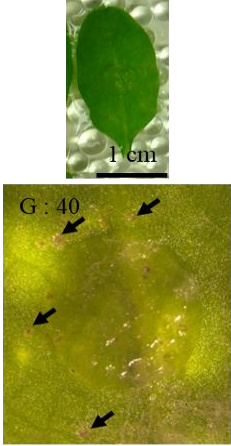
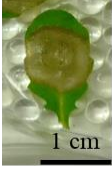



Souches de <i>B. cinerea</i>	B0510	<i>ms</i>	<i>acp1</i>	<i>bot2</i>
2 mM NO ₃ ⁻				
2 mM NH ₄ ⁺				

Figure 5 : Symptômes de macération sur feuilles d'*A. thaliana* Col-0 cultivées à 2mM de NO₃⁻ ou 2 mM de NH₄⁺, puis inoculées soit avec la souche sauvage B0510, soit avec l'un des 3 mutants (*ms*, *acp1* et *bot2*) de *B. cinerea*. Les flèches noires montrent les nécroses des tissus foliaires. Observations à la loupe binoculaire (G : 16 pour *acp1* et G : 40 pour *bot2*)

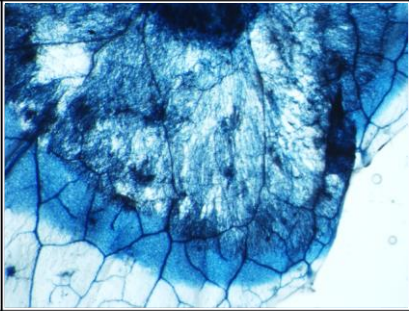
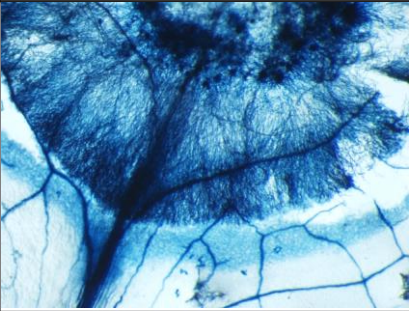
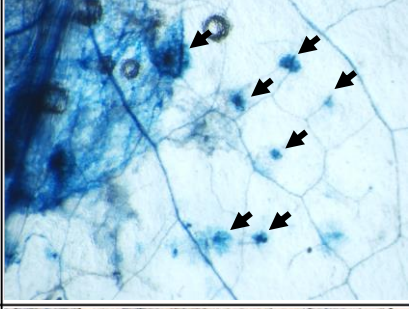
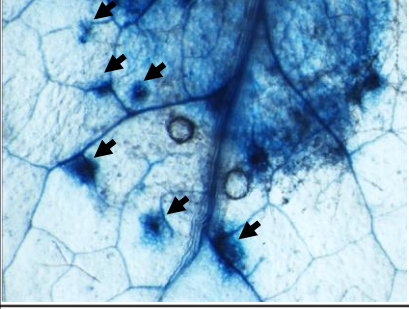
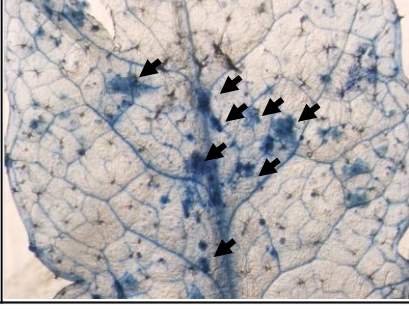
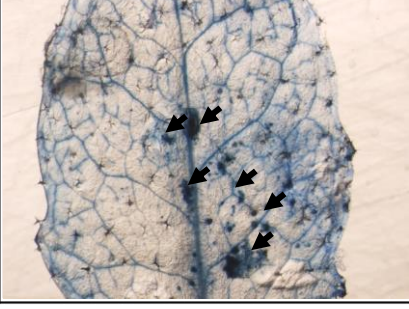
Souches de <i>B. cinerea</i>	2 mM NO ₃	2 mM NH ₄
B0510 Réseau mycélien Cellules végétales mortes		
<i>acp1</i>		
<i>bot2</i>		

Figure 6 : Coloration au bleu de trypan des feuilles d'*A. thaliana* Col-0 inoculées avec la souche sauvage B0510 ou l'un des deux mutants *acp1* et *bot2* de *B. cinerea*. La coloration est réalisée 2 jours après inoculation pour B0510 et *acp1*, ou 4 jours après inoculation pour *bot2*. Les flèches noires montrent les nécroses des tissus foliaires. Les observations sont faites à la loupe binoculaire (G : 16 pour B0510 et *acp1*, G : 8 pour *bot2*).

Sur plantes cultivées en nitrate, on observe à J2 une surface de macération proche de la totalité de la feuille lorsque celle-ci est infectée par la souche sauvage B0510 (Figures 4 et 5). Lorsque la feuille est infectée avec le mutant *ms*, on observe une réduction de 28 % des surfaces de lésions comparativement à la souche sauvage. Quant à l'infection avec les mutants *acp1* et *bot2*, il y a de rares petites nécroses des tissus foliaires. L'infection est réduite de 96 % avec le mutant *acp1* et de 100 % avec la mutant *bot2*.

Sur plantes cultivées en ammonium, de manière générale on observe une réduction des symptômes comparativement aux plantes cultivées en nitrate (Figures 4 et 5). Cette réduction est de 35 % pour l'infection avec la souche sauvage et de 34 % pour l'infection avec la souche mutante *ms*. Si l'on compare les lésions provoquées par le mutant *ms* à celle provoquées par la souche sauvage lorsque les feuilles sont cultivées en ammonium, on observe une réduction de 27 %. Concernant les souches mutantes *acp1* et *bot2*, il y a eu de rares petites nécroses sur les feuilles. L'infection est réduite de 95 % avec le mutant *acp1* et de 100 % avec la mutant *bot2*.

Dans l'ensemble, on peut donc dire que l'ammonium permet à *A. thaliana* d'être plus tolérante à *B. cinerea*. Concernant les différents mutants de *B. cinerea* testés, il s'avère que le métabolite secondaire (*MS*) participe à l'agressivité de *Botrytis*. Quant à la protéase acide (*ACP1*) et à la toxine (*BOT2*), elles semblent contribuer à la virulence de *B. cinerea*.

C. Observation des infections à la loupe binoculaire

La coloration au bleu de trypan des feuilles d'*A. thaliana* inoculées avec différentes souches de *B. cinerea* nous a permis de mettre en évidence le mycélium *in situ* ainsi que les tissus foliaires morts (Figure 6). Pour la souche sauvage B0510, nous avons observé à J2 un développement mycélien important dans les tissus foliaires à partir de l'explant. Au-delà de cette zone mycélienne, une bande de cellules foliaires est colorée au bleu de trypan, signifiant que ces cellules sont mortes avant même d'être en contact avec le mycélium. Par contre nous n'avons pas détecté de différence nette entre les deux sources d'azote apportées aux plantes.

A un temps court (J2) et plus tardif (J4), le mutant *acp1* de *B. cinerea*, se développe difficilement dans la feuille cultivée en nitrate. Il reste principalement sur l'explant et crée quelques structures aériennes qui entrent en contact un peu plus loin sur la feuille. Ces filaments essaient de pénétrer les tissus, provoquant ainsi des zones nécrotiques. En ammonium, on observe une réaction plus violente avec des zones nécrotiques d'un bleu intense. Ces résultats corroborent la faible virulence de cette souche observée dans la partie précédente (test de pouvoir pathogène).

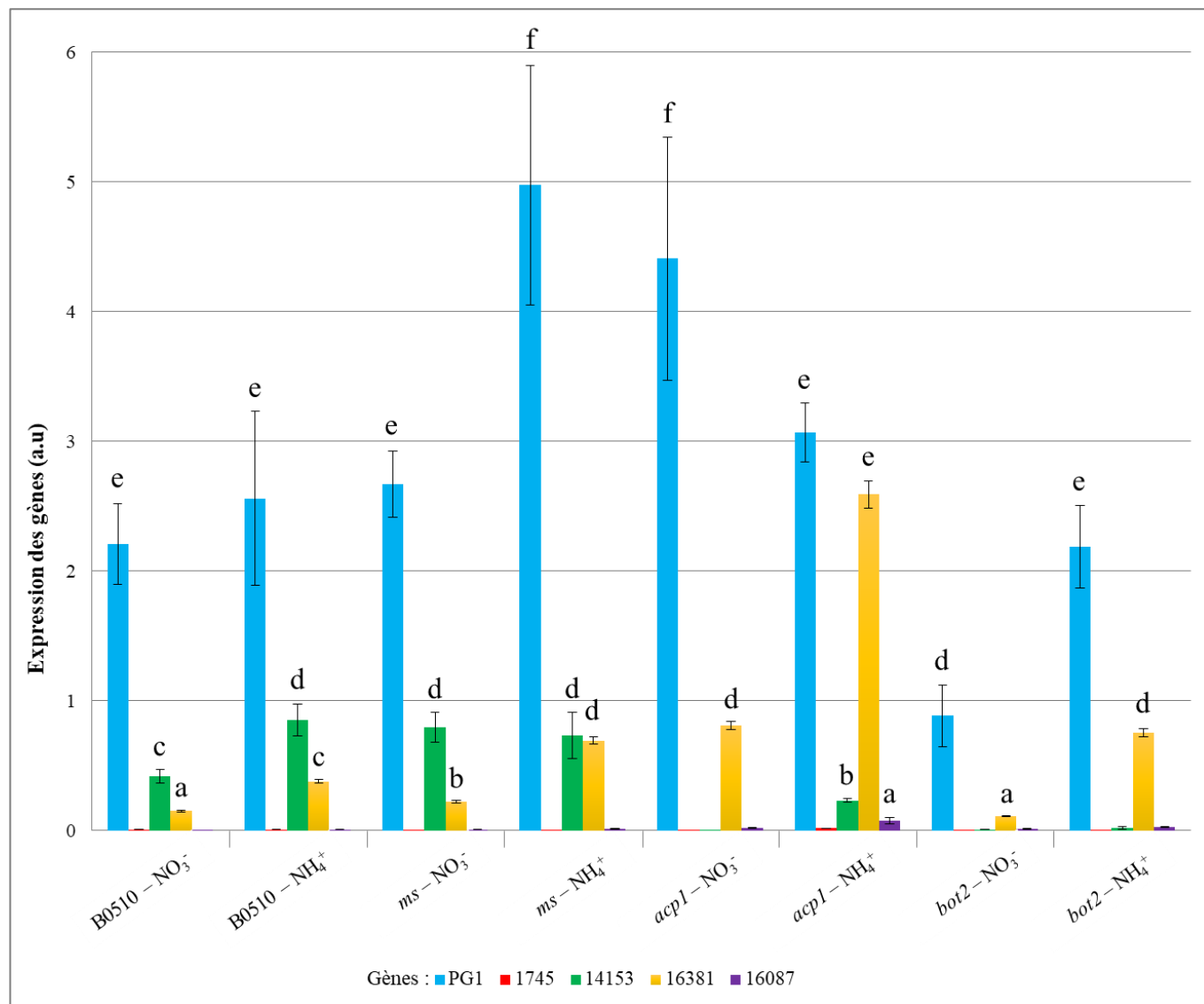


Figure 7 : Expression des différents gènes de *B. cinerea* (PG1, MS = 1745, ACP1 = 14153, BOT2 = 16381, BOA6 = 16087) après 24h d'infection des feuilles d'*A. thaliana* Col-0 cultivées à 2 mM NO₃⁻ ou à 2 mM NH₄⁺. Les niveaux de transcrits ont été normalisés en utilisant l'ACTINE comme gène de référence. L'expérimentation a été répétée 3 fois avec des résultats similaires. Les barres d'erreur représentent l'erreur standard. Test de Mann - Whitney (P = 0,05). a.u : unités arbitraires.

Quant à la souche mutante *bot2*, celle-ci forme un fin réseau mycélien au-dessus de la feuille. Ces filaments tentent de pénétrer à plusieurs endroits mais sans réel succès, provoquant ainsi la mort de quelques cellules touchées par le mycélium. Aucune macération n'est visible. Les observations sont sensiblement identiques entre nitrate et ammonium.

A. Etude de l'expression des gènes dans les tissus foliaires

Après 24 heures d'infection avec l'une des quatre souches de *B. cinerea*, la zone macérée ainsi que les 2 à 3 mm de zone de tissus foliaires adjacents apparemment sains ont été découpés et les ARN extraits. Une transcription inverse a été effectuée sur chaque échantillon d'ARN afin d'obtenir les ADN complémentaires. Une PCR quantitative a été faite sur chacun d'entre eux afin d'étudier l'expression *in planta* des gènes sélectionnés à savoir, *PGI*, *MS*, *ACP1*, *BOT2*, *BOA6* pour le champignon et *PDF1.2a*, *PME17*, *PR1*, *PGIP1*, *PGIP2* pour la plante.

1. Gènes de *B. cinerea*

L'expression de chaque gène de *B. cinerea* est normalisé en utilisant comme gène de référence l'*ACTINE* (Figure 7). L'expression du gène *PGI*, qui code pour une enzyme de dégradation, la polygalacturonase, est le gène le plus fortement exprimé dans toutes nos conditions. Dans les tissus foliaires infectés avec la souche sauvage B0510, il n'est pas différenciellement exprimé que les plantes soient cultivées en nitrate ou en ammonium. Ce n'est pas le cas pour les tissus infectés avec le mutant *ms* où l'expression de *PGI* est plus élevée en ammonium comparativement au nitrate. Pour l'infection avec le mutant de la protéase acide, *acp1*, c'est exactement l'inverse avec une plus faible expression de *PGI* en ammonium. Quant à l'infection avec le mutant de la toxine, *bot2*, l'expression de *PGI* est la plus faible en nitrate comparativement aux résultats obtenus dans les autres tissus foliaires infectés. Mais lorsque les feuilles sont cultivées en ammonium, cette expression double pour ce mutant.

Le gène *01745 (MS)*, qui code pour une enzyme putative de la biosynthèse d'un métabolite secondaire, était fortement exprimé lors de l'analyse du transcriptome réalisé précédemment par l'équipe. Mais cette analyse a été faite sur des tissus foliaires après 6 heures d'infection. Comme on peut l'observer dans nos résultats de qPCR, ce gène n'est exprimé dans aucune de nos conditions 24 heures après infection. Ce gène s'exprimerait donc à des temps plus précoces de l'infection.

Le gène *14153 (ACP1)*, qui code pour une protéase acide, est globalement faiblement exprimé dans toutes nos conditions. On peut toutefois remarquer que dans les tissus foliaires infectés avec la souche B0510, le gène est moins exprimé en nitrate comparativement aux conditions en ammonium. Concernant le mutant *ms*, le niveau d'expression de ce gène dans les tissus foliaires est identique à celui obtenu dans les tissus infectés par la souche sauvage en ammonium.

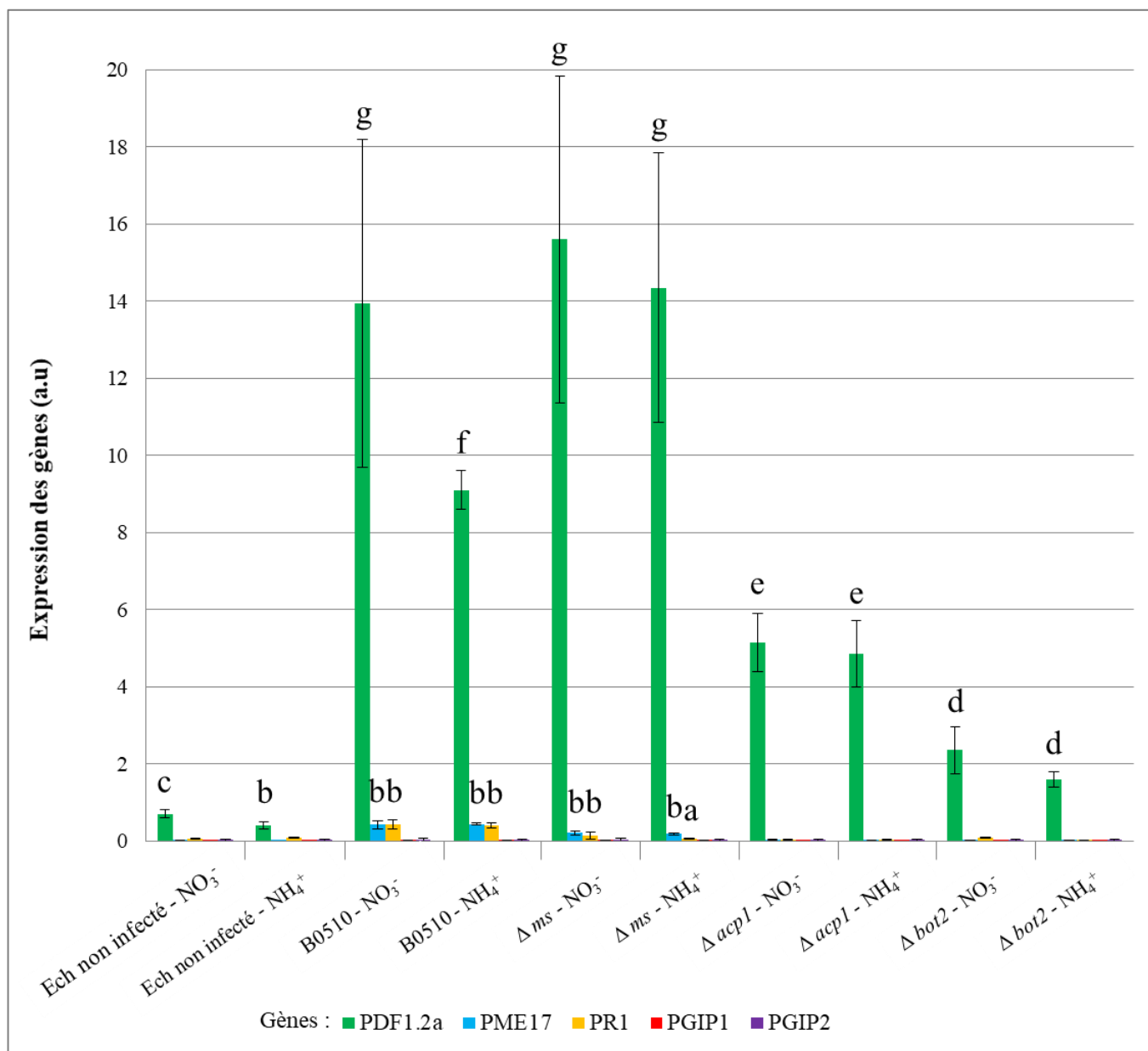


Figure 8 : Expression des différents gènes d'*A. thaliana* (cultivé à 2 mM NO₃⁻ et 2 mM NH₄⁺) après 24h d'infection avec la souche sauvage B0510 ou l'un des trois mutants de *B. cinerea* (*ms*, *acp1* et *bot2*). Les niveaux de transcrits ont été normalisés avec le gène de référence APT. L'expérimentation a été répétée 3 fois avec des résultats similaires. Les barres d'erreur représentent l'erreur standard. Test de Mann - Whitney ($P = 0,05$). a.u : unités arbitraires.

Pour le mutant *acp1*, délété au niveau de ce gène, nous observons tout de même une légère expression en ammonium. Quant au mutant *bot2*, ce gène n'est pas exprimé dans les tissus infectés.

Le gène *16381 (BOT2)*, qui code pour une enzyme de la voie de biosynthèse d'une toxine, le botrydial, est assez faiblement exprimé lorsque les feuilles sont infectées avec la souche B0510 ou les mutants *ms*, *acp1* et *bot2* en nitrate. Par contre, il est toujours plus important en ammonium quelle que soit la souche de *B. cinerea* utilisée pour l'infection. De plus, il est beaucoup plus exprimé dans les tissus infectés par le mutant *acp1* et proche du niveau d'expression du gène *PGI*. On peut toutefois noter que l'expression de ce gène chez le mutant correspondant (*bot2*) nous amène à nous questionner sur les amorces utilisées. En effet, les extrémités du gène *BOT2* sont encore présentes chez le mutant et les amorces se trouvent malheureusement à ce niveau, ce qui explique l'expression du gène chez le mutant *bot2*.

Le gène *16087*, qui code pour une enzyme de la voie de biosynthèse d'une toxine, l'acide botcinique, n'est pas du tout exprimé 24 hpi quelles que soient nos conditions.

2. Gènes d'*A. thaliana*

L'expression de chaque gène d'*A. thaliana* est normalisé en utilisant comme gène de référence *APT* (Figure 8). Le gène *PDF1.2a*, qui code pour une défensine, est un gène marqueur de la voie de la signalisation hormonale de l'acide jasmonique. Dans les plantes non infectées, le gène est très faiblement exprimé que ce soit en nitrate ou en ammonium. Lorsque les feuilles sont infectées avec la souche sauvage B0510 de *B. cinerea*, l'expression de *PDF1.2a* est plus fortement induite chez les plantes cultivées en nitrate comparativement à l'ammonium. Après infection avec le mutant *ms*, l'expression du gène est élevée et proche de celle obtenue avec la souche sauvage quelle que soit la source d'azote apportée à la plante. Pour le mutant *acp1*, l'expression est faible pour les deux conditions de nutrition azotée. Quant au mutant *bot2*, l'expression est la plus faible de toutes les conditions testées.

Le gène *PME17*, qui code pour une pectine méthylestérase, est souvent transcrit en réponse aux infections fongiques et bactériennes. Dans nos conditions, l'expression de ce gène en réponse à l'infection par B0510 et le mutant *ms* est très faible et identique en nitrate et ammonium. Les deux autres mutants *acp1* et *bot2*, n'induisent pas l'expression de ce gène.

Le gène *PR1*, marqueur de la voie de l'acide salicylique et de la réponse systémique acquise (SAR) est très légèrement exprimé uniquement quand les feuilles sont infectées par la souche sauvage B0510.

Quant aux gènes *PGIP1* et *PGIP2*, qui codent pour une protéine inhibant les polygalacturonases, ils ne sont pas exprimés 24 heures après infection des feuilles d'*A. thaliana* et ceci quelle que soit la souche de *B. cinerea* utilisée pour l'infection. Ces gènes choisis lors de l'analyse du transcriptome après 6h d'infection ne sont pas induits après 24h.

IV. Discussion

Des études antérieures, réalisées par l'équipe d'accueil (Fagard *et al.*, 2014 ; Soulié *et al.*, en cours de publication) ont montré que les plantes d'*A. thaliana* infectées avec *B. cinerea* sont plus tolérantes à faible nitrate qu'à fort nitrate. De plus, en comparant les tailles de lésions entre des plantes cultivées en nitrate ou en ammonium à la même concentration, l'équipe a mis en évidence une meilleure tolérance de la plante en ammonium. Un transcriptome a été effectué à un temps précoce d'infection (6h) de feuilles d'*Arabidopsis thaliana* provenant de plantes cultivées à différentes concentrations de nitrate. Une vingtaine de gènes de champignon différentiellement exprimés *in planta* en fonction de la concentration de nitrate ont été sélectionnés puis l'expression vérifiée par qPCR. Les gènes *MS*, *ACP1* et *BOT2* ont été choisis pour notre étude. L'objectif de celle-ci est de voir si ces gènes sont impliqués dans la virulence de *B. cinerea*, et si ils peuvent expliquer la meilleure tolérance d'*A. thaliana* lorsque les plantes sont cultivées en ammonium. Pour cela j'ai travaillé sur 3 mutants de *B. cinerea*, à savoir le mutant *ms* dont le gène codant pour une enzyme de la voie de biosynthèse d'un métabolite secondaire a été délété, le mutant *acp1* dont le gène codant pour une protéase acide a été délété et le mutant *bot2* pour lequel le gène codant pour une toxine appelée botrydial a été délété. Ces travaux pourront permettre de mieux comprendre les mécanismes sous-jacents dans l'interaction *Arabidopsis thaliana* – *Botrytis cinerea* en fonction de la source d'azote.

L'analyse du statut physiologique des tissus foliaires sains a permis de mettre en évidence l'impact de la nutrition azotée chez *A. thaliana*. Pour cela nous avons quantifié différentes molécules à savoir les chlorophylles, flavonols et anthocyanes à l'aide de la pince DUALEX®. Les plantes cultivées en nitrate contiennent significativement plus d'anthocyanes que celles cultivées en ammonium. Par contre l'ammonium semble augmenter la quantité de chlorophylles et de flavonols dans les tissus foliaires comparativement à un apport nutritif en nitrate. Les flavonoïdes (composé de 8 sous-groupes de molécules dont les flavonols (Cook and Samman, 1996)) sont des métabolites secondaires présents dans les plantes. Lors d'un stress, les plantes changent leur statut redox ce qui active la biosynthèse des flavonoïdes et en particulier des flavonols. Ces molécules ont un rôle antioxydant et protègent donc les tissus de la plante en cas de stress abiotiques ou biotiques (Agati *et al.*, 2012). Cet enrichissement en flavonols dans les tissus foliaires sains d'*A. thaliana* cultivés en ammonium pourraient expliquer en partie la meilleure tolérance de la plante face à *B. cinerea* qui est un nécrotrophe et utilise la production de ROS comme stratégie d'attaque.

Dans de nombreuses études qui concernent l'impact de la nutrition azotée sur la plante, il est juste précisé les quantités apportées aux cultures mais aucun dosage *in planta* n'a été effectué afin de connaître la biodisponibilité en nitrate ou en ammonium dans la plante. De plus, dans le cadre d'une interaction plante-pathogène, les études faites sur l'agent pathogène seul, *in vitro*, sont généralement réalisées avec les mêmes concentrations en azote que celles utilisées pour la culture de la plante. Or, cette quantité d'azote n'est pas nécessairement celle disponible *in planta*. Il nous semblait donc important de connaître les

quantités de nitrate et d'ammonium présents dans les tissus sains de feuilles d'*A. thaliana* susceptibles d'être disponible pour la croissance de l'agent pathogène lors de l'interaction. Les plantes cultivées en nitrate sont à 182,3 mM de nitrate et 2,5 mM d'ammonium dans les tissus foliaires. Quant à celles cultivées en ammonium, elles sont à 66,1 mM de nitrate et 5,4 mM d'ammonium. Comme *B. cinerea* présente une croissance optimale *in vitro* avec des concentrations entre 10 et 80 mM de nitrate (Soulié *et al.*, en cours de publication), il est clair que les concentrations en nitrate obtenues dans les feuilles cultivées en ammonium ne permettent pas d'expliquer la meilleure tolérance d'*A. thaliana* face à l'infection par *B. cinerea*. De plus, concernant l'ammonium, la croissance optimale de *B. cinerea in vitro* a été obtenue avec des concentrations entre 3 et 80 mM d'ammonium. Cette source d'ammonium présente *in planta* n'impacte donc pas le développement du champignon.

L'étude du pouvoir pathogène de la souche sauvage de *B. cinerea* et des 3 mutants (*ms*, *acp1* et *bot2*) a permis de vérifier qu'*A. thaliana* est plus tolérante au champignon quand les plantes sont cultivées en ammonium comparativement à celles cultivées en nitrate (réduction d'environ 35 %). Entre la souche sauvage et le mutant *ms*, nous avons observé une diminution d'environ 27 % de l'agressivité que les plantes aient eu un apport nutritif en nitrate ou en ammonium. La diminution de la surface des lésions causées par le mutant *ms*, montre que le gène délété est important et participe à l'agressivité de *B. cinerea*. Le mutant *acp1*, provoque des petites nécroses et plus rarement des petites macérations des tissus foliaires. Ces résultats montrent que le gène *ACP1* qui code pour une protéase acide pourrait être impliqué dans la virulence de champignon vis-à-vis d'*A. thaliana*. Concernant le mutant *bot2*, il n'induit aucune macération tissulaire. Cette délétion du gène *BOT2* codant pour la toxine botrydial semble rendre *B. cinerea* non virulent. Par contre ce mutant garde sa virulence intacte sur haricot (*Phaseolus vulgaris*) (Dalmais *et al.*, 2011). Nous pouvons supposer que les gènes *ACP1* et *BOT2* sont essentiels à la virulence et au développement de *B. cinerea* chez *A. thaliana* ce qui pourrait correspondre à une spécificité de cet hôte.

L'observation à la loupe des infections faites avec les mutants *acp1* et *bot2* a permis d'obtenir un complément d'information sur la réaction de ces souches quand elles sont en contact avec les feuilles d'*A. thaliana*. Après coloration au bleu de trypan on observe facilement le mycélium de la souche sauvage B0510 dans les tissus foliaires. Au-delà de cette zone, on observe une bande de cellules végétales colorées au bleu de trypan, qu'on peut donc supposer mortes alors qu'elles ne semblent pas avoir été en contact avec le mycélium. Avec les souches mutantes, les observations sont différentes. Pour le mutant *acp1*, le champignon reste en grande partie sur l'explant et on observe des zones de pénétration avortées entourées de zones nécrotiques. Elles sont plus intenses quand les plantes sont cultivées en ammonium comparativement au nitrate. Dans le cas de l'infection par le mutant *bot2*, il développe un fin réseau mycélien à la surface de la feuille sans pénétrer les tissus. Dans de rares cas, on observe des zones de pénétration avortées entourées de très petites nécroses, et ceci quelle que soit la source d'azote. Si on s'intéresse au mutant *acp1*, la délétion du gène codant pour la protéase acide semble limiter la propagation

du champignon dans les tissus de la plante hôte. D'autre part, les rares macérations que nous avons pu observer pourraient être dues à une possible blessure des feuilles lors de l'infection facilitant ainsi la pénétration fongique dans les tissus. Cela pourrait être vérifié en blessant ou non des feuilles d'*A. thaliana* juste avant de les inoculer avec le mutant *acp1*. Une étude en microscopie sur des tissus infectés à différents temps d'incubation permettrait de mettre en évidence si cette mutation a un impact sur les mécanismes de pénétration dans les tissus. Quant au mutant *bot2*, la délétion du gène codant pour la toxine rend la souche non virulente. *B. cinerea* produit plusieurs toxines, comme le botrydial ou l'acide botcinique (Choquer *et al.*, 2007). Cependant si l'un des gènes codant pour l'une des deux toxines est délété, l'autre compense généralement et permet au champignon d'être toujours virulent sauf dans le cas d'un double mutant (*bot2/boa6*) où l'agressivité est réduite sur haricot (Dalmais *et al.*, 2011). Dans notre cas nous avons utilisé un simple mutant, *bot2*, et celui-ci semble avoir perdu sa virulence chez *A. thaliana*. Cette toxine serait donc primordiale lors de l'infection dans les feuilles d'*A. thaliana* quelle que soit la source d'azote utilisée lors de la culture de la plante.

Concernant l'étude de l'expression des gènes de *B. cinerea in planta* 24h après infection, le gène *PGI* qui code pour une polygalacturonase (enzyme de dégradation des pectines) particulièrement importante dans le pouvoir pathogène du champignon (Have *et al.*, 1998) s'exprime dans toutes nos conditions expérimentales. Lors de l'infection par la souche sauvage aucune différence significative n'est observée entre le nitrate et l'ammonium pour l'expression de *PGI*. Lorsque les tissus sont infectés par le mutant *ms*, ce gène est plus fortement exprimé en ammonium. Pourtant nous avons mis en évidence une réduction des symptômes en ammonium comparativement au nitrate avec cette souche. Des chercheurs ont travaillé sur la protéine PG1 et ont mis en évidence un double rôle possible pour cette enzyme à savoir celui de dégradation pariétale, et donc un rôle dans la virulence, et celui d'activation de défense de l'hôte (Poinssot *et al.*, 2003). Dans notre cas nous pourrions imaginer que la protéine PG1 active ici les défenses d'*A. thaliana* et contribue ainsi à diminuer l'agressivité de *B. cinerea* dans certaines conditions. Par exemple, lors de l'infection par le mutant *acp1*, pourtant très peu agressif sur *A. thaliana*, nous avons observé une forte expression de PG1 par rapport à la souche sauvage. Cette hypothèse est étayée par la présence de nombreuses petites nécroses sur les feuilles infectées par le mutant *acp1*. Concernant le mutant *bot2*, le gène *PGI* est exprimé même si ce mutant n'occasionne pas de macération des tissus. Les nécroses provoquées par ce mutant sont signe d'une réaction de défense de la plante.

Le gène *MS*, codant pour une enzyme putative de la biosynthèse d'un métabolite secondaire, ne s'exprime dans aucune condition de l'expérimentation. Ce gène avait été choisi à partir du transcriptome fait après 6h après d'infection. Ce résultat pourrait s'expliquer par une expression de ce gène juste à un temps précoce de l'infection. Une cinétique d'expression de ce gène permettrait de connaître à quel temps de l'infection celui-ci est particulièrement important.

L'expression du gène codant pour la toxine botrydiale *BOT2*, est relativement faible dans toutes nos conditions sauf lorsque le mutant *acp1* est inoculé sur des plantes cultivées en ammonium. Mais l'expression de cette toxine ne permet pas au mutant *acp1* de compenser sa faible agressivité.

Concernant l'étude de l'expression de gènes d'*A. thaliana* après 24h d'infection, nous avons sélectionné le gène *PDF1.2a* qui code pour une défensine et est un gène marqueur de la voie de l'acide jasmonique. Cette voie est connue pour être impliquée dans la défense des plantes contre les organismes nécrotrophes. Dans nos échantillons de feuilles non infectées *PDF1.2a* est très faiblement exprimé que ce soit en nitrate ou en ammonium, il n'y a donc pas d'impact de la source d'azote dans les tissus sains au niveau de ce gène. Suite à l'inoculation avec la souche sauvage de *B. cinerea*, l'expression de *PDF1.2a* est très élevée et particulièrement importante en nitrate par rapport à l'ammonium. Il est clair que *B. cinerea*, champignon nécrotrophe, induit la voie de l'acide jasmonique dans nos échantillons de feuilles infectés. Par contre, nous ne pouvons pas expliquer de cette façon la meilleure tolérance d'*A. thaliana* en ammonium. Quand l'inoculation est faite avec le mutant *ms*, le gène s'exprime fortement aussi mais sans différence entre les deux conditions de nutrition azotée. Par contre le gène *PDF1.2a* est plus faiblement exprimé quand les plantes sont inoculées avec les mutants *acp1* et *bot2* sans différence entre les plantes cultivées en nitrate ou en ammonium. Pourtant les mutants *acp1* et *bot2* sont peu voire non virulents. Il semblerait donc que la défense de la plante contre ces mutants ne passe pas par cette voie ou que cette perte de virulence ne soit pas due à la défense induite mais par exemple à un effet de la structure des tissus d'*A. thaliana*.

Le gène *PR1* est très faiblement exprimé. Or, ce gène est plutôt un gène marqueur d'infection par des organismes biotrophes ce qui pourrait expliquer qu'il soit faiblement exprimé dans notre cas vu que *B. cinerea* est un nécrotrophe. Les autres gènes, quant à eux, ont une expression très faible en comparaison à *PDF1.2a*. Il est possible qu'ils soient exprimés à un temps plus précoce.

V. Conclusions et perspectives

Mes travaux ont permis de mettre en évidence le rôle de deux gènes, *ACPI* et *BOT2*, dans la virulence de *B. cinerea* sur *Arabidopsis*. J'ai également mis en évidence le rôle du gène, *MS*, dans l'agressivité de *B. cinerea*.

Concernant le gène *MS*, codant une enzyme de biosynthèse d'un métabolite secondaire, le mutant correspondant présente une baisse d'agressivité par rapport à la souche sauvage, mais nous n'avons observé ni baisse d'expression des gènes de virulence testés ni augmentation des gènes de défense testés qui permettraient d'expliquer la diminution d'agressivité. Il serait donc intéressant de tester chez ce mutant, l'expression d'autres gènes de virulence connus (*PME1*, *PME2* & *PME3*, *PL*, et autres *PGs*) ou de mesurer l'expression des gènes de cette étude à un temps plus précoce. Pour ce mutant, nous avons observé une expression plus forte du gène *PG1*, en ammonium, qui est connu pour avoir un rôle à la fois dans la virulence et dans l'activation des défenses. Afin de tester le rôle du gène *PG1*, il serait intéressant de réaliser des infiltrations avec la protéine PG1 purifiée après inactivation ou non de cette protéine. Par ailleurs, il serait intéressant de mesurer, suite à l'infection par le mutant *ms*, l'expression d'autres gènes de défense de la plante, comme *PAD3*, de quantifier l'accumulation de métabolites liés à la défense (flavonols), ou de mesurer l'accumulation de composés pariétaux liés à la défense (callose). Il serait également intéressant de réaliser le métabolome de cette souche mutante et de le comparer à celui de la souche sauvage afin d'identifier le métabolite produit par l'enzyme codée par le gène *MS*.

Concernant le mutant *acp1* qui est affecté dans une protéase sécrétée *in planta* et qui présente une très faible virulence, nous n'avons observé ni baisse d'expression des gènes de virulence testés ni augmentation des gènes de défense testés qui permettraient d'expliquer la baisse d'agressivité. Comme pour le mutant *ms*, il serait donc intéressant d'étudier d'autres gènes d'agressivité de *B. cinerea* ainsi que de défense de la plante, ou de tester des points de cinétique plus précoces. Enfin, puisque le gène *ACPI* code pour une protéase sécrétée *in planta*, il serait très intéressant de réaliser un protéome de feuille infectée par la souche sauvage et le mutant *acp1* afin d'identifier la cible d'*ACPI*.

Concernant le gène *BOT2*, qui code pour une enzyme de biosynthèse d'une toxine, nous avons malheureusement détecté un signal en qPCR avec les amorces choisies dans le mutant de délétion *bot2*. Cela peut s'expliquer par le fait qu'il reste une fraction du gène *BOT2* dans le mutant et il sera donc nécessaire de dessiner de nouvelles amorces dans la zone délétée du gène afin de vérifier que ce mutant porte bien la délétion attendue. De manière surprenante, le mutant *bot2* est non virulent sur *A. thaliana* alors qu'il est virulent sur haricot. Afin de déterminer si le phénotype observé sur *A. thaliana* est une exception, il serait intéressant de mesurer la virulence de ce mutant sur différentes espèces hôtes pour *B. cinerea* comme la tomate, la vigne et la fraise. De plus, comme pour les deux autres mutants, il serait intéressant d'étudier d'autres gènes de virulence que *PG1* et d'autres défenses. D'autre part, sur haricot, le mutant est

virulent parce qu'il est redondant avec le gène *BOA6* qui code pour une enzyme de biosynthèse de l'acide botcinique. Cela signifie soit que l'acide botcinique n'est pas fonctionnel chez *A. thaliana*, et donc spécifique à d'autres espèces, soit que *BOA6* ne s'exprime pas correctement chez *Arabidopsis*. Nous avons en effet observé une absence d'expression de *BOA6* dans toutes nos conditions, il faudra donc vérifier si *BOA6* s'exprime à d'autres points de cinétique.

Nous n'avons pas identifié de gène de défense ou de molécule de défense dont l'expression ou l'accumulation expliquerait les augmentations de tolérance (en ammonium ou en réponse aux mutants). Si nos travaux futurs (voir ci-dessus) permettent d'identifier des gènes de défense ou des molécules de défense qui s'accumulent plus fortement en réponse aux mutants qu'en réponse à la souche sauvage, il sera intéressant de tester les mutants de plante correspondant. Ceci permettra de déterminer si ces mutants permettent de restaurer l'agressivité ou la virulence des souches mutées. En particulier, les mutants *pad3* (affecté dans la production de camalexine) et *jar1* (affecté dans la perception de la signalisation dépendante de l'acide jasmonique) seraient à tester en priorité. Par ailleurs, une analyse du métabolome de la plante dans les conditions de plus forte tolérance permettrait de faire une recherche sans *a priori* de métabolites associés à la tolérance.

Concernant la forte tolérance des plantes cultivées en ammonium, nous n'avons pas observé d'augmentation de l'expression de gènes de défense en réponse à la souche sauvage qui permettraient d'expliquer l'augmentation de la tolérance en ammonium. Il serait intéressant de tester d'autres gènes comme *PAD3* ainsi que le mutant correspondant. De plus, nous avons observé que les plantes cultivées en ammonium présentent une plus forte accumulation de flavonols qui pourraient expliquer cette augmentation de tolérance. Comme des mutants affectés dans la biosynthèse des flavonols existent, nous pourrions les tester et déterminer s'ils conservent ou non leur forte tolérance en ammonium. Enfin, il serait intéressant de travailler sur différentes combinaisons de nitrate et d'ammonium afin de déterminer dans quelles conditions l'ammonium augmente la tolérance (seul ou en combinaison avec le nitrate). Ces dernières expériences pourraient également être menées sur d'autres espèces hôtes de *B. cinerea*, comme la tomate, et éventuellement constituer une méthode de lutte contre *B. cinerea*.

VI. Références bibliographiques

A. Articles scientifiques :

- Agati, G., Azzarello, E., Pollastri, S. and Tattini, M.** (2012) Flavonoids as antioxidants in plants: Location and functional significance. *Plant Science*, 196, 67–76.
- Aguileta, G., Lengelle, J., Chiapello, H., et al.** (2012) Genes under positive selection in a model plant pathogenic fungus, *Botrytis*. *Infection, Genetics and Evolution*, 12, 987–996.
- Amselem, J., Cuomo, C.A., Kan, J.A.L. van, et al.** (2011) Genomic Analysis of the Necrotrophic Fungal Pathogens *Sclerotinia sclerotiorum* and *Botrytis cinerea*. *PLOS Genetics*, 7, e1002230.
- Arbelet, D., Malfatti, P., Simond-Côte, E., Fontaine, T., Desquilbet, L., Expert, D., Kunz, C. and Soulié, M.-C.** (2010) Disruption of the *Bcchs3a* Chitin Synthase Gene in *Botrytis cinerea* Is Responsible for Altered Adhesion and Overstimulation of Host Plant Immunity. *MPMI*, 23, 1324–1334.
- Ballini, E., Nguyen, T.T. and Morel, J.-B.** (2013) Diversity and genetics of nitrogen-induced susceptibility to the blast fungus in rice and wheat. *Rice*, 6, 32.
- Blanco-Ulate, B., Morales-Cruz, A., Amrine, K.C.H., Labavitch, J.M., Powell, A.L.T. and Cantu, D.** (2014) Genome-wide transcriptional profiling of *Botrytis cinerea* genes targeting plant cell walls during infections of different hosts. *Front. Plant Sci.*, 5.
- Büttner, P., Koch, F., Voigt, K., Quidde, T., Risch, S., Blaich, R., Brückner, B. and Tudzynski, P.** (1994) Variations in ploidy among isolates of *Botrytis cinerea*: implications for genetic and molecular analyses. *Curr Genet*, 25, 445–450.
- Choquer, M., Fournier, E., Kunz, C., Levis, C., Pradier, J.-M., Simon, A. and Viaud, M.** (2007) *Botrytis cinerea* virulence factors: new insights into a necrotrophic and polyphageous pathogen. *FEMS Microbiol Lett*, 277, 1–10.
- Cook, N.C. and Samman, S.** (1996) Flavonoids—Chemistry, metabolism, cardioprotective effects, and dietary sources. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, 7, 66–76.
- Dalmaï, B., Schumacher, J., Moraga, J., Pêcheur, P.L., Tudzynski, B., Collado, I.G. and Viaud, M.** (2011) The *Botrytis cinerea* phytotoxin botcinic acid requires two polyketide synthases for production and has a redundant role in virulence with botrydial. *Molecular Plant Pathology*, 12, 564–579.
- Dean, R., Van Kan, J. a. L., Pretorius, Z.A., et al.** (2012) The Top 10 fungal pathogens in molecular plant pathology. *Molecular Plant Pathology*, 13, 414–430.
- Dordas, C.** (2009) Role of Nutrients in Controlling Plant Diseases in Sustainable Agriculture: A Review. In *Sustainable Agriculture*. Springer, Dordrecht, pp. 443–460.
- Dulermo, T., Bligny, R., Gout, E. and Cotton, P.** (2009) Amino acid changes during sunflower infection by the necrotrophic fungus *B. cinerea*. *Plant Signaling & Behavior*, 4, 859–861.
- Fagard, M., Launay, A., Clément, G., Courtial, J., Dellagi, A., Farjad, M., Krapp, A., Soulié, M.-C. and Masclaux-Daubresse, C.** (2014) Nitrogen metabolism meets phytopathology. *J Exp Bot*, 65, 5643–5656.

- Glazebrook, J.** (2005) Contrasting Mechanisms of Defense Against Biotrophic and Necrotrophic Pathogens. *Annual Review of Phytopathology*, 43, 205–227.
- Gómez-Gómez, L. and Boller, T.** (2002) Flagellin perception: a paradigm for innate immunity. *Trends in Plant Science*, 7, 251–256.
- Hahlbrock, K., Bednarek, P., Ciolkowski, I., et al.** (2003) Non-self recognition, transcriptional reprogramming, and secondary metabolite accumulation during plant/pathogen interactions. *PNAS*, 100, 14569–14576.
- Have, A. ten, Mulder, W., Visser, J. and Kan, J.A.L. van** (1998) The Endopolygalacturonase Gene Bcpg1 Is Required for Full Virulence of *Botrytis cinerea*. *MPMI*, 11, 1009–1016.
- Lecompte, F., Abro, M.A. and Nicot, P.C.** (2010) Contrasted responses of *Botrytis cinerea* isolates developing on tomato plants grown under different nitrogen nutrition regimes. *Plant Pathology*, 59, 891–899.
- Leroch, M., Kretschmer, M. and Hahn, M.** (2011) Fungicide Resistance Phenotypes of *Botrytis cinerea* Isolates from Commercial Vineyards in South West Germany: Fungicide Resistance of *B. cinerea* Isolates from Vineyards. *Journal of Phytopathology*, 159, 63–65.
- Leroux, P., Fritz, R., Debieu, D., Albertini, C., Lanen, C., Bach, J., Gredt, M. and Chapeland, F.** (2002) Mechanisms of resistance to fungicides in field strains of *Botrytis cinerea*. *Pest. Manag. Sci.*, 58, 876–888.
- Mazzotta, S. and Kemmerling, B.** (2011) PATTERN RECOGNITION IN PLANT INNATE IMMUNITY. *Journal of Plant Pathology*, 93, 7–17.
- Miller, A.J. and Cramer, M.D.** (2005) Root nitrogen acquisition and assimilation. In *Root Physiology: from Gene to Function*. Plant Ecophysiology. Springer, Dordrecht, pp. 1–36.
- Miranda, K.M., Espey, M.G. and Wink, D.A.** (2001) A Rapid, Simple Spectrophotometric Method for Simultaneous Detection of Nitrate and Nitrite. *Nitric Oxide*, 5, 62–71.
- Patterson, K., Cakmak, T., Cooper, A., Lager, I., Rasmusson, A.G. and Escobar, M.A.** (2010) Distinct signalling pathways and transcriptome response signatures differentiate ammonium- and nitrate-supplied plants. *Plant, Cell & Environment*, 33, 1486–1501.
- Piasecka, A., Jedrzejczak-Rey, N. and Bednarek, P.** (2015) Secondary metabolites in plant innate immunity: conserved function of divergent chemicals. *New Phytol*, 206, 948–964.
- Poinssot, B., Vandelle, E., Bentejac, M., et al.** (2003) The endopolygalacturonase 1 from *Botrytis cinerea* activates grapevine defense reactions unrelated to its enzymatic activity. *Mol. Plant-Microbe Interact.*, 16, 553–564.
- Raun, W.R. and Johnson, G.V.** (1999) Improving Nitrogen Use Efficiency for Cereal Production. *Agronomy Journal*, 91, 357–363.
- Rolland, S.G. and Bruel, C.A.** (2008) Sulphur and nitrogen regulation of the protease-encoding *ACPI* gene in the fungus *Botrytis cinerea*: correlation with a phospholipase D activity. *Microbiology*, 154, 1464–1473.
- Snoeijs, S.S., Pérez-García, A., Joosten, M.H.A.J. and Wit, P.J.G.M.D.** (2000) The Effect of Nitrogen on Disease Development and Gene Expression in Bacterial and Fungal Plant Pathogens. *European Journal of Plant Pathology*, 106, 493–506.

- Staats, M., Baarlen, P. van, Kan, V. and L, J.A.** (2005) Molecular Phylogeny of the Plant Pathogenic Genus *Botrytis* and the Evolution of Host Specificity. *Mol Biol Evol*, 22, 333–346.
- Tilman, D., Cassman, K.G., Matson, P.A., Naylor, R. and Polasky, S.** (2002) Agricultural sustainability and intensive production practices. *Nature*.
- Vega, A., Canessa, P., Hoppe, G., Retamal, I., Moyano, T.C., Canales, J., Gutiérrez, R.A. and Rubilar, J.** (2015) Transcriptome analysis reveals regulatory networks underlying differential susceptibility to *Botrytis cinerea* in response to nitrogen availability in *Solanum lycopersicum*. *Front. Plant Sci.*, 6.
- Walters, D. r. and Bingham, I. j.** (2007) Influence of nutrition on disease development caused by fungal pathogens: implications for plant disease control. *Annals of Applied Biology*, 151, 307–324.
- Wang, E., Schornack, S., Marsh, J.F., Gobbato, E., Schwessinger, B., Eastmond, P., Schultze, M., Kamoun, S. and Oldroyd, G.E.D.** (2012) A common signaling process that promotes mycorrhizal and oomycete colonization of plants. *Curr. Biol.*, 22, 2242–2246.
- Wei, Z.M., Sneath, B.J. and Beer, S.V.** (1992) Expression of *Erwinia amylovora* hrp genes in response to environmental stimuli. *J. Bacteriol.*, 174, 1875–1882.
- Williamson, B., Tudzynski, B., Tudzynski, P. and Kan, J. a. L.V.** (2007) *Botrytis cinerea*: the cause of grey mould disease. *Molecular Plant Pathology*, 8, 561–580.
- Wu, S., Shan, L. and He, P.** (2014) Microbial signature-triggered plant defense responses and early signaling mechanisms. *Plant Science*, 228, 118–126.
- Wyrsh, I., Domínguez-Ferreras, A., Geldner, N. and Boller, T.** (2015) Tissue-specific FLAGELLIN-SENSING 2 (FLS2) expression in roots restores immune responses in *Arabidopsis* fls2 mutants. *New Phytol*, 206, 774–784.

B. Sites internet :

- Pince DUALEX SCIENTIFIC : <http://www.force-a.com/capteurs-optiques-optical-sensors/dualex-scientific-chlorophyll-meter/>
- Photographie Figure 1 B : https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Sauternes_noble_rot_grapes.jpg
- Photographie Figure 1 C : <http://www.agrimaroc.ma/botrytis-lutter-contre-la-pourriture-grise-de-la-tomate/>
- Photographie Figure 1 D : https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Aardbei_Lambda_vruchtrot_Botrytis_cinerea.jpg

VII. Annexes

Annexe 1 : composition des solutions nutritives en nitrate et ammonium

Solution à 2 mM de NO ₃ ⁻ (nitrate)				
Solution mère A	Quantité	Masse molaire	Volume	Utilisation solution fille
KH ₂ PO ₄	34 g	136,09	5 L	5 mL/L
MgSO ₄ 7H ₂ O	61,5 g	246,47		
Solution mère B	Quantité	Masse molaire	Volume	Utilisation solution fille
KNO ₃ ⁻	176,8 g	101,1	5 L	5 mL/L
CaN ₂ O ₆ 4H ₂ O	29,5 g	236,15		
CaCl ₂ 2H ₂ O	18,48 g	147,02		
Fer séquestrène	10 g		1 L	1 mL/L
Oligoéléments	100 ml			
Solution à 2 mM de NH ₄ ⁺ (ammonium)				
Solution mère A	Quantité	Masse molaire	Volume	Utilisation solution fille
KH ₂ PO ₄	170 g	136,09	5 L	5 mL/L
MgSO ₄ 7H ₂ O	30 g	246,47		
(NH ₄ ⁺) ₂ SO ₄	132 g	132,14		
Solution mère B	Quantité	Masse molaire	Volume	Utilisation solution fille
CaCl ₂ 2H ₂ O	27,75 G	147,02	5 L	5 mL/L
Fer séquestrène	10 g		1 L	1 mL/L
Oligoéléments	100 ml			

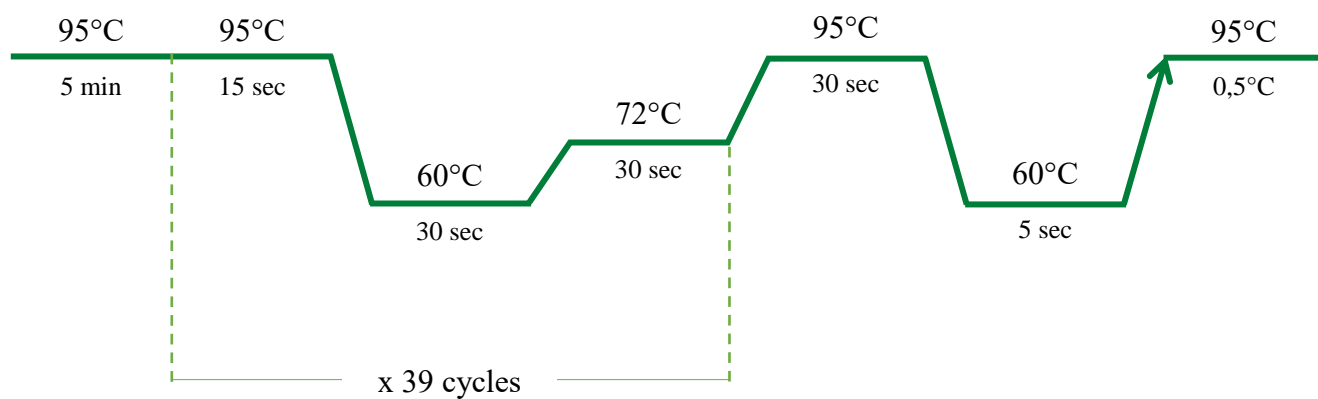
Annexe 2 : Gènes de *B. cinerea* testés avec les amorces utilisées et les fonctions putatives des gènes

Code AGI et Gènes de <i>B. cinerea</i>	Séquence sens	Séquence anti-sens	Fonction putative du gène
BC1G_08198 <i>ACTINE A</i>	cgccattgctcgtgttgac	tcggcagtggaggagaaagt	Composant du cytosquelette
BC1G_11143 <i>PGI</i>	ccctctccggcattacatcc	cgttggttagcactggaggag	PolyGalacturonase 1
BC1G_01745 <i>MS</i>	accagaagccgacagatacc	gccctcagtaacgctcaaag	Métabolite secondaire
BC1G_14153 <i>ACPI</i>	caagggcaagagtgtttccc	caacaagggaacagtcggtg	Protéase acide
BC1G_16381 <i>BOT2</i>	gtcagctgcatttcctctc	ggtcgttacttgggtcctga	Toxine sesquiterpène botrydial
BC1G_16087 <i>BOA6</i>	gaacgctcaggtcgattcac	cgaggattagcatgccatcg	Polykétide synthase Acide botcinique

Annexe 3 : Gènes d'*A. thaliana* testés avec les amorces utilisées et les fonctions putatives des gènes

Code AGI et Gènes de <i>A. thaliana</i>	Séquence sens	Séquence anti-sens	Fonction putative du gène
At1g27450 <i>APT</i>	cctattgcgttggtattg	tctcactcctactcgttc	Adenine phosphoribosyl transferase.
At5g44420 <i>PDF1.2a</i>	tttgcttccatcatcacccttatctt	acacttgtgtgctgggaaga	Plant Defensin 1.2a.
At2g45220 <i>PME17</i>	tggtggaggaggaacgacaa	tgacggttgagtgaaacgta	Pectine MéthylEstérase 17
At2g14610 <i>PR1</i>	ctggctattctcgatttttaacg	tcttgcataatgatgctcctattg	Pathogen Recognition 1
At5g06860 <i>PGIP1</i>	gccaaactcaagaacctccg	acgaccaaatactctggt	PolyGalacturonase Inhibiting Protein 1 et 2
At5g06870 <i>PGIP2</i>	ggcaatcccgaactttaccg	ctccctgtgatgccattgtg	

Annexe 4 : Programme de qPCR suivi par le thermocycleur utilisé pour les expressions de gènes de plante et de champignon



L'azote est un élément nutritif essentiel pour les végétaux. Cet intrant, apporté sous deux formes, le nitrate (NO_3^-) et l'ammonium (NH_4^+) permet un meilleur rendement aux cultures. Toutefois, il peut impacter la sévérité des maladies. Le champignon nécrotrophe polyphage, *Botrytis cinerea*, deuxième pathogène d'intérêt économique et scientifique majeur, réagit différemment selon les concentrations d'azote apporté aux cultures. En effet, à faible nitrate, l'équipe d'accueil a montré qu'*A. thaliana* est plus tolérante à *B. cinerea*. Une analyse transcriptomique a été effectuée à un temps précoce de l'infection par *B. cinerea* (6 hpi) sur des tissus d'*A. thaliana* Col-0 cultivés à différentes concentrations de NO_3^- . En parallèle, l'équipe a montré que les plantes cultivées en NH_4^+ étaient plus tolérantes à *B. cinerea* que les plantes cultivées à une concentration équivalente de NO_3^- . A l'issue de cette analyse, 3 gènes de *B. cinerea* ont été sélectionnés: le gène *MS* codant pour une enzyme qui entre dans la voie de biosynthèse d'un métabolite secondaire, le gène *ACPI* codant pour une protéase acide putative et le gène *BOT2* codant pour une enzyme qui entre dans la voie de biosynthèse d'une toxine appelée botrydial. Les différentes souches de *B. cinerea*, sauvage ou portant une délétion pour un des trois gènes mentionnés, ont été inoculées sur *A. thaliana* Col-0 cultivée avec 2 mM de NO_3^- ou NH_4^+ . Le mutant *ms* montre une baisse de son agressivité et les mutants *acp1* et *bot2* ont perdu en grande partie leur virulence sur *A. thaliana*. Ces trois gènes sont donc importants pour la virulence de *B. cinerea*. L'expression de plusieurs gènes a été étudiée dont celle de *PG1* chez *B. cinerea*. Celui-ci s'exprime fortement dans toutes nos conditions, suggérant un rôle prépondérant de ce gène. La protéine codée par *PG1* est une polygalacturonase connue à la fois comme facteur de virulence et inducteur de défense chez la plante. On pourrait faire l'hypothèse que la forte expression de *PG1* observée dans les tissus infectés par les mutants contribuerait à une augmentation de l'activation des défenses de la plante et donc à une baisse de virulence. Concernant les gènes de défense, nous n'avons pas observé d'augmentation de leur induction dans les conditions où la plante est plus tolérante à *B. cinerea* (sur NH_4^+ et en réponse aux mutants). L'analyse d'autres gènes de défense de la plante pourrait expliquer ces différences.

Mots clés : *Arabidopsis*, Azote, *Botrytis*, défense, virulence

Nitrogen is an essential nutrient for plants. This input, provided in two forms, nitrate (NO_3^-) and ammonium (NH_4^+) allows a better yield to crops. However, it can impact the severity of diseases. The polyphagous necrotrophic fungus, *Botrytis cinerea*, the second major pathogen of economic and scientific interest, reacts differently according to the nitrate concentrations used in cultures. Indeed, at low nitrate, the host team has shown that *A. thaliana* was more tolerant to *B. cinerea* in these conditions. A transcriptomic analysis was performed by the host team at an early time of *B. cinerea* infection (6 hpi) on *A. thaliana* Col-0 tissues grown at different concentrations of NO_3^- . The team also showed that plants grown in ammonium were more tolerant to *B. cinerea* than plants grown at the same concentration of nitrate. At the end of this analysis, 3 genes of *B. cinerea* were selected : the *MS* gene coding for an enzyme part of the biosynthetic pathway of a secondary metabolite, the *ACPI* gene coding for a putative acid protease and the *BOT2* gene coding an enzyme part of the biosynthetic pathway of a toxin called botrydial. The different strains of *B. cinerea*, wild-type or harbouring a deletion for one of the three genes, were inoculated on *A. thaliana* Col-0 grown with 2 mM NO_3^- or NH_4^+ . The *ms* mutant shows a decrease in its aggressiveness and the *acp1* and *bot2* mutants have largely lost their virulence on *A. thaliana*. These three genes are important for the virulence of *B. cinerea*. The expression of several genes has been studied, including *PG1* in *B. cinerea*. It is strongly expressed in all conditions, suggesting a preponderant role of this gene. The protein encoded by *PG1* is a polygalacturonase known both as a virulence factor and a defense inducer in plants. It could be hypothesized that the high expression of *PG1* observed in the mutant-infected tissues would contribute to an increase in the activation of plant defenses and thus to a decrease in virulence. Regarding defense genes, we did not observe an increase in their induction under conditions where the plant is more tolerant to *B. cinerea* (on NH_4^+ and in response to mutants). Analysis of other plant defense genes may explain these differences.

Key words : *Arabidopsis*, Nitrogen, *Botrytis*, defense, virulence