

Master "Biologie Végétale" co-acrédité :
Université d'Angers, Nantes Université et
l'Institut Agro Rennes-Angers

U.F.R.
Centre INRAE d'Angers,
Pays de la Loire

RAPPORT de STAGE EFFECTUE

par

Amandine RIGAUD

Au sein de l'UMR IRHS (équipe FungiSem)
Centre INRAE d'Angers

en vue de l'obtention du

Master Biologie Végétale
Parcours : Plant and Health Protection

(Responsables de stage : Romain Berruyer et Nelly Bataillé-Simoneau,
Maîtres de conférence à l'université d'Angers)

Sujet :

**ETUDE DE LA VOIE DE BIOSYNTHÈSE DE L'ALDAULACTONE, TOXINE PRODUITE
PAR LE CHAMPIGNON NECROTROPHE *ALTERNARIA DAUCI***

Soutenance devant le jury d'examen le 11/06/2024

Master "Biologie Végétale" co-acrédité :
Université d'Angers, Nantes Université et
l'Institut Agro Rennes-Angers

U.F.R.
Centre INRAE d'Angers,
Pays de la Loire

RAPPORT de STAGE EFFECTUE

par

Amandine RIGAUD

Au sein de l'UMR IRHS (équipe FungiSem)
Centre INRAE d'Angers

en vue de l'obtention du

Master Biologie Végétale Parcours : Plant and Health Protection

(Responsables de stage : Romain Berruyer et Nelly Bataillé-Simoneau,
Maîtres de conférence à l'université d'Angers)

Sujet :

**ETUDE DE LA VOIE DE BIOSYNTHÈSE DE L'ALDAULACTONE, TOXINE PRODUITE
PAR LE CHAMPIGNON NECROTROPHICHE *ALTERNARIA DAUCI***

Soutenance devant le jury d'examen le

11/06/2024

Remerciements

Avant de vous laisser parcourir les pages de ce rapport, je tenais à remercier toutes les personnes qui ont contribué, de près comme de loin, à l'écriture de cet ouvrage et au bon déroulement de mon stage qui clôture parfaitement mes cinq années d'études.

En premier lieu, je remercie chaleureusement Romain Berruyer et Nelly Bataillé-Simoneau, mes tuteurs de stage, pour leur accompagnement tout au long de ses six mois, pour leur bienveillance, pour leurs conseils constructifs, notamment lorsque j'étais confrontée à quelques difficultés, et surtout de m'avoir permis de travailler sur un sujet passionnant.

Je remercie également la totalité de l'équipe FungiSem pour leur accueil plus que chaleureux, et en particulier le directeur d'équipe Pascal Poupart qui n'a jamais manqué une occasion de s'enquérir de mon avancée et de mon bien-être durant ce stage. Je présente également ma gratitude à Justine Colou qui m'a été d'une aide précieuse grâce à son expertise lors des expériences de transformation.

Mes remerciements vont également à Maël Baudin, mon tuteur pédagogique, qui s'est montré très disponible et à l'écoute. Ses conseils avisés m'ont grandement aidée dans la rédaction de ce rapport qui vous est aujourd'hui présenté.

Mon stage n'aurait pas été aussi agréable sans mes voisines de bureau Liljia, Clara et Isabelle avec qui j'ai pu partager des discussions et des rires. Nous nous sommes également apporté mutuellement de l'aide concernant nos expériences ou questionnements, afin de toujours nous tirer vers le haut. La compagnie de mon ami Antoine, avec qui j'ai passé mes années d'études angevines, a également été une stimulation grâce à nos échanges journaliers sur nos sujets respectifs et nos moments de pause quand nos esprits devenaient trop encombrés.

Je remercie également ma maman, qui m'a encouragée tout au long de ce stage et qui a pris le temps de lire ce rapport pour chasser les dernières fautes cachées entre les lignes, ainsi que ma sœur pour une ultime relecture.

Enfin, je voudrais dire merci, merci infiniment à la personne qui m'a suivie tout au long de ce stage, à chaque instant, et qui est devenu un ami très cher: Jérôme Bernardino. Ses connaissances et sa rigueur scientifique m'ont permis de développer de multiples compétences interdisciplinaires et de pousser ma réflexion plus avant. Nous avons tout partagé durant ces six mois, les réussites comme les doutes. Au-delà de l'aspect professionnel, Jérôme et son grand cœur m'ont fait grandir humainement. Alors merci, merci pour tout, merci pour ce que tu m'as appris, merci de m'avoir supportée et soutenue, et merci d'être devenu un incroyable ami !

Je terminerai ce rapport en ayant une pensée toute particulière à ma grand-mère pour lui dire : « Ça y est, j'ai réussi ! Je suis allée jusqu'au bout ! ». Je la remercie pour tout ce qu'elle m'a donné durant ma courte vie, et pour tout le soutien sans faille qu'elle m'aurait encore apporté au quotidien.



ENGAGEMENT DE NON PLAGIAT

Je, soussigné (e) Amandine Rigaud, déclare être pleinement conscient(e) 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 :

A handwritten signature in blue ink, appearing to read "Amandine Rigaud".

Cet engagement de non plagiat doit être inséré en première page de tous les rapports, dossiers, mémoires.

Table des matières

GLOSSAIRE

Abréviations

Liste des figures et liste des tableaux

Liste des annexes

I. INTRODUCTION BIBLIOGRAPHIQUE	1
A. <i>Daucus carota – Alternaria dauci</i> , un pathosystème non modèle	1
1. <i>Daucus carota</i> , le légume-racine le plus cultivé au monde.....	1
2. <i>Alternaria dauci</i> et la brûlure foliaire	2
3.Principales méthodes de lutte contre <i>Alternaria dauci</i>	3
B.Toxines et résistance	4
1.Résistance partielle dans le pathosystème <i>A. dauci – D. carota</i>	4
2.Rôle des toxines dans l'interaction <i>A. dauci – D. carota</i>	4
3.Aldaulactone	5
C.Problématique et objectif du stage.....	6
II.MATÉRIELS ET MÉTHODES.....	7
A.Matériel fongique et milieux de culture	7
B.Analyse de la production d'aldaulactone des mutants déjà existants.....	7
1.Préparation des exsudats fongiques	7
2.HPLC-UV	8
C.Analyse phénotypique des mutants déjà existants	8
1.Mesure de la croissance mycélienne	8
2.Analyse phénotypique des conidies	8
3.Analyses statistiques	9
D.Création de mutants.....	9
1.Extraction d'ADN.....	9
2.DJ-PCR.....	9
3.Transformation de protoplastes.....	10
4.Vérification de la transformation	11
III.RÉSULTATS	11
A.Étude phénotypique des mutants préexistants	11
1.Croissance mycélienne	11
2.Phénotype des conidies.....	11
B.Détection de la production d'aldaulactone chez les mutants préexistants	12
C.Obtention de nouveaux mutants KO.....	13
IV.DISCUSSION	15
A.Effets dus à la transformation.....	15
B.Abolition de la production d'aldaulactone.....	17
C. Nouvelles transformations d' <i>A. dauci</i>	18
V.CONCLUSION	19
VI.PERSPECTIVES	20
BIBLIOGRAPHIE ET SITOGRAPHIE	
ANNEXES	

GLOSSAIRE

Allogame : qualifie une plante dont le mode de reproduction favorise la fécondation croisée entre individus différents et qui, par conséquent, limite l'autofécondation

Conidie : spore assurant la reproduction asexuée chez les organismes fongiques, en particulier les ascomycètes

Cluster : désigne un groupe de deux ou plusieurs gènes, proches les uns des autres, et dont les fonctions sont voisines

Effets pléiotropes : effets phénotypiques *a priori* indépendants attribués à un seul gène ou à une seule protéine

Forme parfaite : désigne la forme de reproduction sexué d'un champignon, quand il existe également une forme asexuée. Elle est également appelée forme téloïomorphe.

Forme imparfaite : désigne la forme de reproduction asexuée d'un champignon. Elle est également appelée forme anamorphe.

Hyphe : élément végétatif filamenteux, plus ou moins ramifié, qui constitue l'appareil végétatif des champignons, également appelé mycélium

Inoculum primaire : unité initiatrice responsable des premières infections, souvent au printemps après une période de dormance hivernale

Inoculum secondaire : unité produite en quantité à partir des infections primaires et qui disperse l'épidémie

Monosporage : technique d'isolement des spores de champignons sur milieu sélectif afin d'obtenir des individus distincts issus du développement d'une seule conidie

Phytoalexines : composés chimiques de faible poids moléculaire produit par la plante de novo afin de se défendre contre l'attaque d'un bioagresseur

Phytoanticipes : composés de faible poids moléculaire à effet antimicrobien, qui sont déjà présents dans la plante avant une interaction avec un microorganisme, ou bien produits après l'infection uniquement à partir de constituants préexistants

Protoplaste : cellule végétale, bactérienne ou fongique dépourvue de paroi et obtenue expérimentalement

Pseudoappressorium : structure fongique similaire à un appressorium, c'est-à-dire un système produit par le champignon parasite ou symbiotique à l'extrémité d'un tube germinatif afin de pénétrer les tissus de l'hôte

Synctium : structure cellulaire à plusieurs noyaux dans un cytoplasme commun, pouvant résulter de la fusion de plusieurs cellules mononucléées

Abréviations

ALB : *Alternaria Leaf Blight* (alternariose de la carotte)

AMP: Adénosyne Mono Phosphate

AT : Acytransférase

AUC: *Area Under the Curve* (aire sous la courbe)

DJ-PCR: *Double-Joint Polymerase Chain Reaction* (Double PCR conjointe)

EDTA : *Ethylenediamine Tetraacetic Acid* (acide tétraacétique éthylénediamine)

HPLC : *High Performance Liquid Chromatography* (chromatographie liquid à haute performance)

HST : *Host Specific Toxin* (toxine spécifique de l'hôte)

HygB : Hygromycine B

ITS : *Internal Transcribed Spacer* (espaceur interne transcrit)

KO : *Knock Out*

KS : Kétide Synthase

mAU: *milli absorbance unit* (milli-unité d'absorbance)

MO : Monoxygénase

MT : Méthyltransférase

NC : Non Codant

nHST : *non-Host Specific Toxin* (toxine non spécifique de l'hôte)

pb : paire de bases

PDA : Potato Dextrose Agar

PDB : Potato Dextrose Broth

PEG: Polyéthylène Glycol

PT : *Product Template*

PKS: *Polyketid Synthase* (polycétide synthase)

QRL : *Quantitative Resistance Locus* (locus de résistance quantitative)

SAT : *Starter-unit Acyltransferase* (unité initiatrice acyltransférase)

SONAS : Substance d'Origine Naturelle et Analogues Structuraux

sp : *subspecies*

TE : Thioestérase

UV : Ultraviolet

Liste des figures

Figure 1 : Cycle de vie d'*Alternaria dauci* sur son hôte *Daucus carota* (schéma adapté par Elza Neau (2021) d'après Agrios, 2005)

Figure 2 : Structures des toxines à lactone macrocyclique

Figure 3 : Schéma de représentation du cluster 8 d'*Alternaria dauci* et de ses différents gènes

Figure 4 : Voie de biosynthèse hypothétique de l'aldaulactone (Courtial et al., 2022)

Figure 5 : Production de la cassette de résistance par PCR double-joint et transformation des protoplastes *Alternaria dauci*

Figure 6 : Aire sous la courbe (AUC) et phénotype de la souche sauvage (FRA001) et des souches mutantes d'*Alternaria dauci* sur boîte

Figure 7 : Longueur des conidies de la souche sauvage (FRA001) et des souches mutantes d'*Alternaria dauci*

Figure 8 : Ratio de la longueur du corps sur la longueur du bec des conidies de la souche sauvage (FRA001) et des souches mutantes d'*Alternaria dauci*

Figure 9 : Conidies de la souche sauvage (FRA001) et des souches mutantes d'*Alternaria dauci* observées au microscope optique, grossissement x20

Figure 10 : Extraits organiques des souches d'*Alternaria dauci* analysés par HPLC-UV

Figure 11 : Chromatogramme HPLC-UV (305 nm) des extraits organiques des milieux de cultures des souches d'*Alternaria dauci*, première répétition technique

Figure 12 : Gels d'électrophorèse (agarose 1.2%) des produits PCR correspondant à l'amplification des cassettes de résistance

Figure 13 : Observation sur boîte des potentiels mutants Δ MT et Δ MO

Figure 14 : Gels d'électrophorèse (agarose 1,2%) de vérification des produits PCR des potentiels transformants sur le gène codant la méthyltransférase et des potentiels transformants sur le gène codant la monooxygénase

Figure 15 : Analyse de l'aldaulactone purifiée par HPLC-DAD à quatre longueurs d'ondes différentes (Courtial et al., 2018)

Liste des tableaux

Tableau 1 : Variétés de carottes mises sur le marché et leur niveau de résistance à *A. dauci* (Courtial, 2019 ; d'après le catalogue officiel des espèces et variétés de plantes cultivées en France et les catalogues professionnel de Vilmorin et de Clause)

Tableau 2 : Programmes utilisés pour la PCR double-joint

Tableau 3 : Programme utilisés pour la PCR de vérification de l'ADN des potentiels transformants

Tableau 4 : Taux de conidies présentant une déformation pour chaque souche d'*Alternaria dauci*

Liste des annexes

Annexe I : Protocole d'extraction d'ADN génomique fongique par micro-ondes

Annexe II : Protocole de transformation de protoplastes d'*Alternaria dauci* adapté d'un protocole de transformation de protoplastes d'*Alternaria brassicicola*

Annexe III : Liste des amorces utilisées

Annexe IV : Temps de rétention (min) et pourcentage d'absorption (%) lors de la HPLC

Étude de la voie de biosynthèse de l'aldaulactone

I. INTRODUCTION BIBLIOGRAPHIQUE

A. *Daucus carota – Alternaria dauci*, un pathosystème non modèle

1. *Daucus carota*, le légume-racine le plus cultivé au monde

La carotte (*Daucus carota* L.) est une plante dicotylédone de la famille des Apiacées, autrefois nommée Ombellifères. Cette famille, regroupant plus de trois cents genres, se caractérise par des inflorescences en forme d'ombelle, et compte également d'autres espèces cultivées comme légumes ou condiments, telles que le fenouil (*Foeniculum vulgare* Mill.), le céleri (*Apium graveolens* L.), le persil (*Petroselinum crispum* (Mill.) Fuss), l'aneth (*Anethum graveolens* L.) ou la coriandre (*Coriandrum sativum*, L.) (Rodriguez-Concepcion *et al.*, 2013).

L'espèce *D. carota* L. englobe les variétés de carottes cultivées et des génotypes sauvages (Stolarczyk et Janick, 2011). Les plantes de cette espèce sont allogames, leur cycle de vie est le plus souvent annuel pour les formes sauvages, et biennal pour les formes cultivées, que l'on regroupe parfois dans la sous-espèce *D. carota subsp sativus*. Elles ont toutes un génome diploïde constitué de neuf paires de chromosomes (2n=18).

La carotte est le légume-racine le plus cultivé au monde. Sa racine pivot tubérisée est appréciée pour son goût sucré, sa facilité d'emploi, sa couleur vive et son faible coût. Elle présente également de nombreux bénéfices nutritionnels puisqu'elle est source de sucres, de minéraux et de vitamines (Bauernfeind, 1972). La production mondiale de carottes et navets a été estimée à plus de 42 millions de tonnes en 2022 (FAOSTAT, 2022 [1]), dont plus de 12 millions de tonnes produites par la Chine. L'Europe constitue le deuxième bassin majeur de production, avec la France en septième position qui comptabilise 867 tonnes produites en 2022 (FAOSTAT, 2022 [1]).

La domestication de la carotte serait assez récente : elle aurait eu lieu il y a environ mille cent ans en Asie centrale (Iorizzo *et al.*, 2013). Il a été montré que les carottes sauvages étaient clairement séparées des carottes cultivées, formant un groupe monophylétique (Iorizzo *et al.*, 2013). Les premières carottes cultivées étaient de couleur jaune ou violette. La coloration orange vif de la racine que l'on connaît aujourd'hui et qui est due à l'accumulation de carotène peut être considérée comme le résultat de la sélection de mutants à partir de cultivars européens jaunes (Stolarczyk et Janick, 2011).

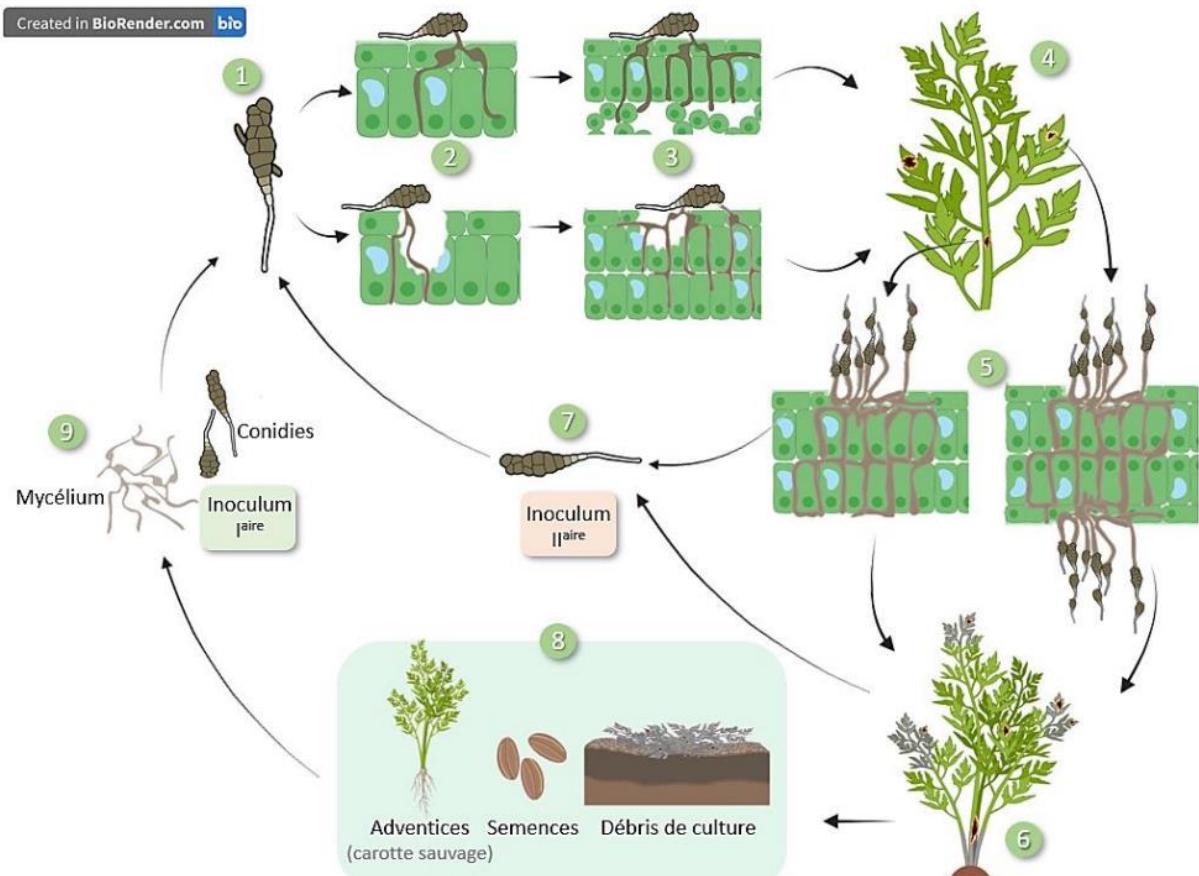


Figure 1 : Cycle de vie d'*Alternaria dauci* sur son hôte *Daucus carota* (schéma adapté par Elza Neau (2021) d'après Agrios, 2005)

1: Germination de la conidie

2 : Pénétration directe ou via une blessure dans les jonctions intracellulaires

3 : Invasion des tissus foliaires et caulinaires

4 : Apparition de lésions précoces

5 : Sporulation, production de nouvelles conidies sur tissus infectés

6 : Symptômes prononcés de brûlure

7 : Infection de nouvelles plantes

8 : Conservation de l'inoculum primaire pendant l'hiver

9 : Inoculum primaire capable d'infecter une nouvelle plante

La couleur de la racine constitue par ailleurs l'un des principaux critères de sélection, au même titre que la richesse en réserves, les qualités nutritionnelles et gustatives, et la réduction des ramifications secondaires (Stolarczyk et Janick, 2011). Ce n'est que plus tard que l'on s'est intéressé à la résistance aux maladies comme critère de sélection. En effet, la culture intensive, l'émergence de maladies et les pertes de rendement considérables ont poussé les sélectionneurs à faire de la résistance aux maladies un important critère de sélection (Simon *et al.*, 2008).

2. *Alternaria dauci* et la brûlure foliaire

La brûlure foliaire (*Carrot leaf blight* en anglais) constitue la principale maladie foliaire de la carotte. Elle se caractérise par des taches nécrotiques entourées d'un halo chlorotique sur les feuilles, entraînant une perte de l'activité photosynthétique ainsi qu'une réduction de la production de carbohydrates (Boedo *et al.*, 2012). Les feuilles, devenues trop fragiles, rendent difficile la récolte mécanique, qui se fait par préhension des fanes (Boedo *et al.*, 2012).

Les symptômes de brûlure foliaire peuvent être dus à plusieurs agents pathogènes, dont la bactérie *Xanthomonas campestris* pv. *carotae* (Umesh *et al.*, 1998) et le champignon *Cercospora carotae* (Bounds *et al.*, 2006), mais on considère généralement qu'*Alternaria dauci* en est le principal responsable. C'est pour cela que la brûlure foliaire est également appelée alternariose, ou *Alternaria Leaf Blight* (ALB), lorsque les brûlures sont dues à ce champignon.

A. dauci est un Ascomycète nécrotrophe de la famille des Pleosporacées et de la classe des Dothideomycètes. Le genre imparfait *Alternaria* regroupe plus de trois cents espèces, certaines ayant des formes parfaites appartenant à divers genres proches les uns des autres (*Clathrospora*, *Leptosphaeria*, *Lewia*, *Pleospora*). Pour d'autres espèces, telles qu'*A. dauci*, aucune forme parfaite n'a été observée. Au sein de ce genre sont classées de nombreuses autres espèces phytopathogènes nécrotropes telles qu'*A. brassicicola*, *A. porri*, ou encore certains groupes au sein de l'espèce *A. alternata* (Lawrence *et al.*, 2016). D'autres espèces sont des saprophytes, d'autres encore ont un comportement intermédiaire de pathogènes de faiblesse, hâtant la mort d'organes végétaux sénescents.

Les sources d'inoculum primaire sont diverses. En effet, l'infection peut se propager depuis les semences, les plantes, les débris et même les carottes sauvages (Farrar *et al.*, 2004 ; Fig. 1). Les conidies sont la principale forme de l'inoculum secondaire et permettent la transmission de la maladie d'individu à individu. Lorsqu'une conidie arrive à la surface d'un organe de la plante, chacune des cellules qui la compose peut former un tube germinatif (Boedo *et al.*, 2008). L'étape suivante est la pénétration, qui se fait le plus souvent à travers les jonctions

Tableau 1 : Variétés de carottes mises sur le marché et leur niveau de résistance à *A. dauci* (Courtial, 2019 ; d'après le catalogue officiel des espèces et variétés de plantes cultivées en France et les catalogues professionnel de Vilmorin et de Clause)

Dénomination	Première inscription	Obtenteurs	Résistance à <i>A. dauci</i>
Scarla	1971	Clause Semences SA (FR)	S
Nanco	1980	Vilmorin SA (FR)	S
Presto	1987	Vilmorin SA (FR)	S
Sénior	1990	Clause Semences SA (FR)	IR
Baléro	1991	Vilmorin SA (FR)	HR
Concerto	1995	Vilmorin SA (FR)	S
Maestro	1996	Vilmorin SA (FR)	HR
Carlo	1996	Tézier SA (FR)	IR
Soprano	1999	Vilmorin SA (FR)	HR
Tempo	1999	Vilmorin SA (FR)	S
Sirocco	2002	Vilmorin SA (FR)	HR
Ceres	2002	Clause Semences SA (FR)	IR
Artemis	2002	Clause Semences SA (FR)	S
Eskimo	2002	Vilmorin SA (FR)	S
Texto	2004	Vilmorin SA (FR)	HR
Volcano	2004	Vilmorin SA (FR)	HR
Exelso	2004	Vilmorin SA (FR)	S
Coreo	2005	Vilmorin SA (FR)	IR
Silvano	2009	Vilmorin SA (FR)	HR
Match	2009	Clause (FR)	S
Extremo	2010	Vilmorin SA (FR)	HR
Musico	2010	Vilmorin SA (FR)	HR
Phoenix	2010	Clause (FR)	HR
Brutus	2010	Clause (FR)	S
Stromboli	2011	Clause (FR)	HR
Olimpo	2011	Vilmorin SA (FR)	HR
Attilio	2011	Vilmorin SA (FR)	IR
Mercurio	2011	Clause (FR)	S
Octavo	2012	Vilmorin SA (FR)	IR
Santorin	2013	Clause (FR)	HR
Hekla	2013	Clause (FR)	IR
Melodio	2015	Vilmorin SA (FR)	HR
Diamento	2015	Vilmorin SA (FR)	HR
Priam	2015	Clause (FR)	IR
Speedo	2016	Vilmorin SA (FR)	HR
Subito	2016	Vilmorin SA (FR)	IR

S : variété sensible

IR : résistance modérée/intermédiaire

HR : haute résistance

intracellulaires. Cette pénétration peut se faire via la formation d'un pseudoappressorium, mais celui-ci n'est pas toujours observé. Les hyphes se développent ensuite dans les tissus de l'hôte, et provoquent la mort des cellules, ce qui explique la nécrose observée. A partir de cette nécrose, le champignon va puiser des nutriments et produire des conidies qui seront dispersées, pouvant ainsi reproduire le cycle infectieux (Boedo *et al.*, 2010 ; Dugdale *et al.*, 2000 ; Fig. 1). Le champignon est capable d'infecter tous les organes aériens de la plante, dont les inflorescences, et par ce biais les semences, ce qui explique son potentiel transport sur de grandes distances par le commerce international de ces dernières.

3. Principales méthodes de lutte contre *Alternaria dauci*

L'alternariose est la maladie foliaire de la carotte la plus préjudiciable économiquement, pouvant entraîner des pertes de rendements de 40 à 60% (Ben-Noon *et al.*, 2001). Pour contrer cette maladie, plusieurs méthodes sont déjà utilisées, voire combinées, telles que la rotation des cultures (Farrar *et al.*, 2004), la certification de lots de graines saines (ministère de l'Agriculture, de l'Agroalimentaire et de la Forêt, arrêté du 12 mars 2014), ou encore l'utilisation de fongicides. En particulier, la lutte contre l'alternariose représente la moitié des fongicides utilisés sur carotte (AGRESTE, 2015 [2]).

Une autre technique de lutte repose sur l'utilisation de variétés résistantes. Dans bien des cas, la lutte génétique semble constituer une alternative aux produits phytosanitaires qui deviennent de plus en plus réglementés et coûteux et dont l'impact environnemental et sanitaire est de plus en plus questionné. Dans le cas de la carotte, une augmentation lente mais régulière du niveau de résistance à l'alternariose des variétés mises sur le marché est observée depuis plusieurs décennies (Courtial, 2019 ; Tab. 1). En revanche, aucune résistance totale n'a été remarquée chez la carotte face à *A. dauci*, et les niveaux de résistance actuels ne permettent pas de se passer de traitements fongicides.

Une meilleure connaissance de ces déterminants génétiques, ainsi que des mécanismes impliqués dans l'interaction carotte - *A. dauci* représenteraient une avancée majeure dans la lutte contre l'alternariose en permettant une accélération de l'amélioration pour ce caractère. Dans ce cadre, une démarche de cartographie génétique a permis de mettre en évidence un certain nombre de Loci de Résistance Quantitative (*Quantitative Resistant Loci*, ou QRL ; Le Clerc *et al.*, 2009). Les mécanismes de l'interaction ont aussi été étudiés, et en particulier le rôle pris par les toxines dans celle-ci.

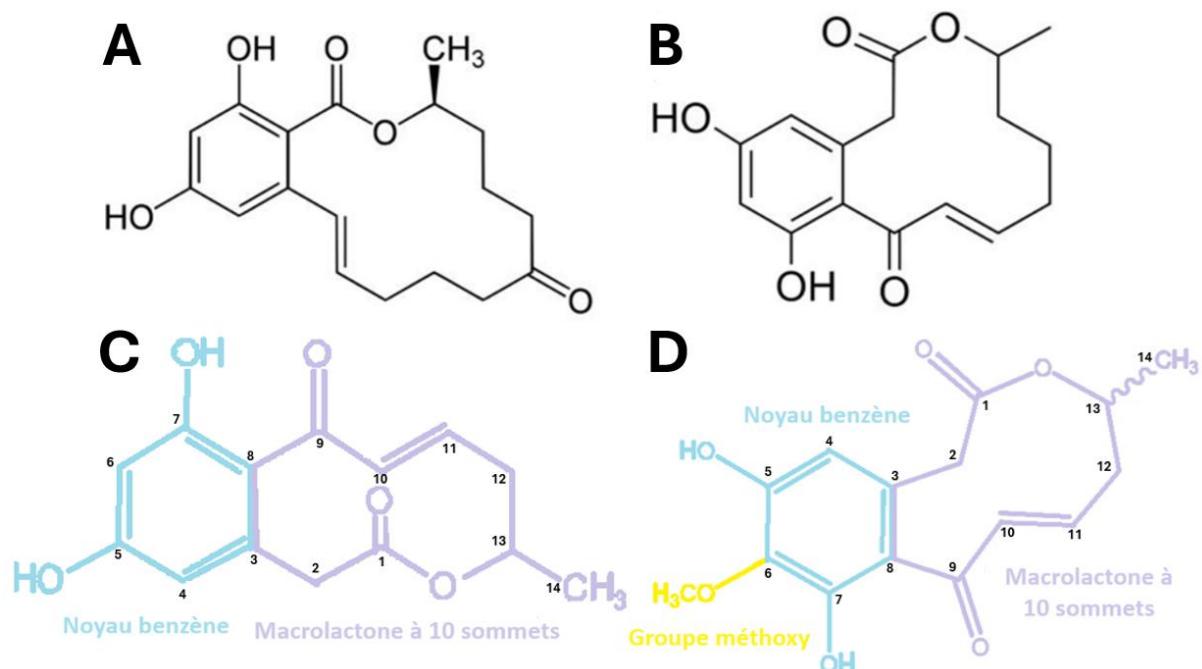


Figure 2 : Structures des toxines à lactone macrocyclique

A) Zéaralénone B) 10,11-déhydrocurvularine C) Sporostatine
D) Aldaulactone

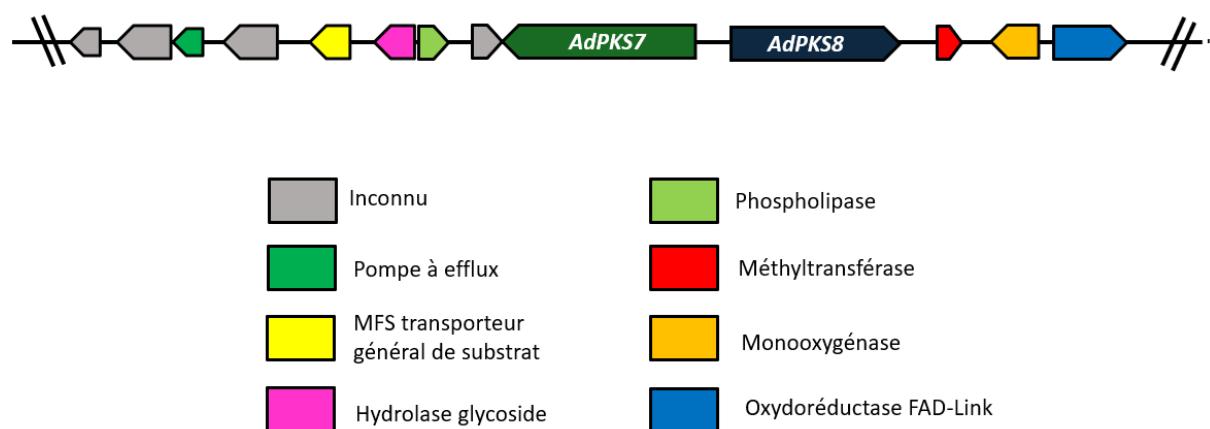


Figure 3 : Schéma de représentation du cluster 8 d'*A. dauci* et ses différents gènes

B. Toxines et résistance

1. Résistance partielle dans le pathosystème *A. dauci – D. carota*

Les résistances partielles, ou quantitatives, se basent sur des mécanismes encore mal connus, contrairement aux résistances totales qui ont déjà été largement étudiées. Néanmoins, elles suscitent de plus en plus d'intérêt car elles auraient l'avantage d'être moins facilement contournées par rapport aux résistances totales (ou qualitatives). Ce possible avantage de la résistance quantitative sur la résistance totale est dû à ses effets plus subtils qui induisent une pression de sélection plus faible sur le pathogène, et à un nombre de gènes impliqués bien plus important qui ralentissent la capacité adaptative de celui-ci (Poland *et al.*, 2009).

Six catégories de mécanismes de la résistance partielle sont proposées par Poland *et al.* (2009). L'un de ces mécanismes s'appuie sur la notion de « guerre chimique » qui implique la production de métabolites secondaires de la part des deux individus du pathosystème et qui constituent leurs arsenaux offensifs : les phytoalexines et les phytoanticipines sont produites par la plante tandis que les phytotoxines sont produites par le champignon pathogène.

La corrélation positive entre phytotoxines et résistance dans un pathosystème a déjà été démontrée plusieurs fois dans le cas de résistances totales, comme dans le cas des AAL-toxines dans le pathosystème *A. alternata f. sp. Lycopersici* - tomate (Brandwagt *et al.*, 2000), ou encore la HC-toxine dans le pathosystème *Cochliobolus carbonum* - maïs (Meeley et Walton, 1991). Les exemples sont beaucoup plus rares concernant les résistances quantitatives. La SS-toxine est l'un de ces rares cas. Elle est produite par le champignon *Stemphylium solani*, pathogène sur l'ail (*Allium sativum*), et a été caractérisée il y a quelques années, mais aucune description de sa structure n'a encore été réalisée (Zheng *et al.*, 2010). Les travaux de Lecomte *et al.* (2014) ont quant à eux révélé une corrélation entre l'agressivité des souches d'*A. dauci* et leur production de toxines, mais également une corrélation entre la résistance aux toxines et la résistance partielle dans le pathosystème *A. dauci* – carotte.

2. Rôle des toxines dans l'interaction *A. dauci – D. carota*

Les toxines, métabolites secondaires de faible poids moléculaire, sont des facteurs importants du pouvoir pathogène des champignons nécrotropes. Elles se distinguent en deux catégories : les toxines spécifiques de l'hôte (HST) et les toxines non spécifiques de l'hôte (nHST). Les HST ont une action毒ique souvent très forte, mais limitée à un petit nombre d'espèces végétales proches, correspondant à l'hôte de l'agent pathogène considéré. Elles

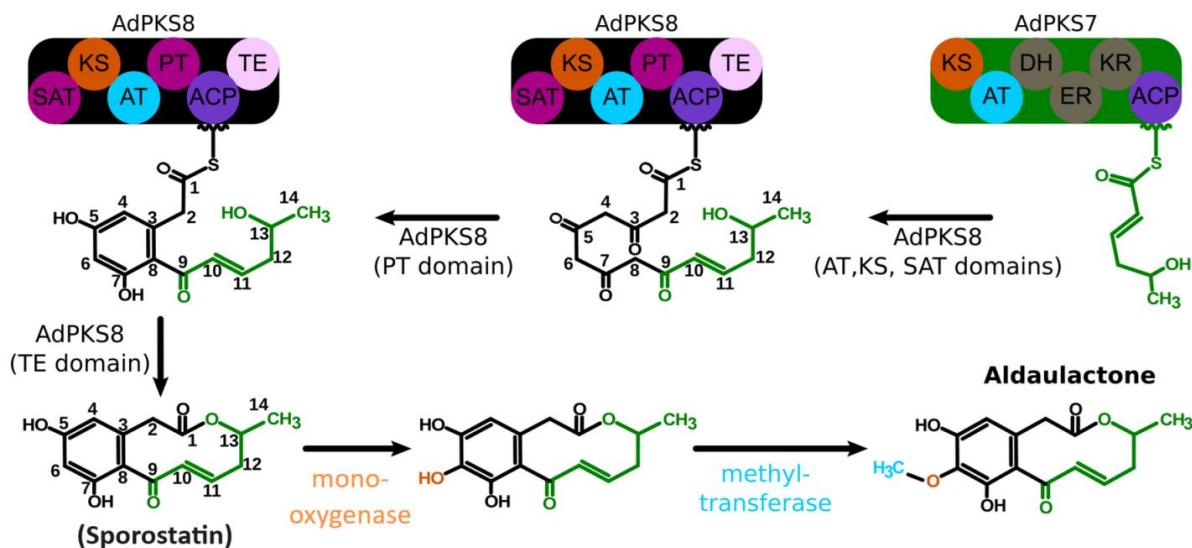


Figure 4 : Voie de biosynthèse hypothétique de l’aldaulactone (Courtial *et al.*, 2022)

AdPKS7 produit un polycétide réduit. Les domaines AT, KS et SAT de la AdPKS8 catalysent l’ajout de quatre unités malonyle-CoA avant que le domaine PT ne catalyse la cyclisation du noyau benzène en C3-C8. L’AdPKS8 catalyse ensuite la cyclisation du macrolactone grâce à son domaine TE. La monooxygénase du cluster 8 catalyse l’addition d’une fonction alcool en C6, elle-même méthylée par la méthyltransférase du cluster 8.

Légende : AT : domaine acyltransferase ; ACP : domaine acyl carrier protein ; DH : domaine dehydratase; ER : domaine enoyreductase ; KR : domaine ketoreductase ; KS : domaine ketosynthase ; PT : domaine product template ; SAT : domaine starter unit transacétylase ; TE : domaine thioestérase

s'intègrent dans la composante qualitative (ou virulence) du pouvoir pathogène. Les nHST appartiennent quant à elles à la composante quantitative (ou agressivité) du pouvoir pathogène. Leur toxicité est souvent plus faible, mais elles agissent sur une large gamme d'espèces.

Dans le genre *Alternaria*, plus de soixante-dix toxines ont été identifiées parmi les espèces phytopathogènes (Meena *et al.*, 2017). Bien que les HST soient caractéristiques du genre *Alternaria*, aucune HST n'a été clairement caractérisée chez l'espèce *A. dauci*. Sept phytotoxines ont été isolées et identifiées chez cette espèce. Parmi elle, le zinniol a longtemps été soupçonné d'être la toxine jouant un rôle majoritaire dans le pouvoir pathogène d'*A. dauci*, hypothèse depuis remise en cause (Qui *et al.*, 2010 ; Lecomte *et al.*, 2014).

Une nouvelle toxine a été mise en lumière (Courtial *et al.*, 2018) et serait en grande partie responsable du pouvoir pathogène d'*A. dauci*. Il s'agit de l'aldaulactone, purifiée et caractérisée avec l'aide de l'unité SONAS. Ces travaux ont révélé le caractère bivalent de cette nouvelle toxine : l'aldaulactone serait en effet l'acteur majoritaire dans le pouvoir pathogène d'*A. dauci*, mais serait également impliquée dans la résistance quantitative de la carotte.

3. Aldaulactone

L'aldaulactone est un polycétide qui appartient à la famille des benzènediol lactones. Ces dernières sont caractérisées par deux cycles partageant deux carbones, un grand cycle lactone (dix sommets dans le cas de l'aldaulactone), et un noyau benzène comportant deux fonctions alcool (Fig. 2). L'aldaulactone présente une structure similaire à celle d'autres métabolites secondaires fongiques déjà décrits dans la littérature, dont deux ont une voie de biosynthèse connue : la zéaralénone produites par *Gibberella zae* (Urry *et al.*, 1966), et la déhydrocurvularine par *Alternaria cinerariae* (Arai *et al.*, 1989 ; Fig. 2).

La synthèse du squelette carboné des polycétides est le fait de polycétides synthases (*PolyKetide Synthase*, PKS). Dans le cas des benzènediol lactones comme la zéaralénone et la déhydrocurvularine, deux PKS sont impliquées dans leur voie de biosynthèse : une polycétide synthase réductrice et une polycétide synthase non réductrice. En supposant que la voie de biosynthèse de l'aldaulactone implique également deux PKS, l'analyse bio-informatique sur le génome d'*A. dauci* (Courtial *et al.*, 2022) a permis d'identifier, au sein d'un même cluster (le cluster 8), deux gènes candidats codant pour deux PKS, *AdPKS7* qui code une enzyme réductrice, et *AdPKS8* qui code une enzyme non réductrice (Fig. 3). Deux autres gènes codant pour deux autres enzymes potentiellement impliquées dans la biosynthèse de l'aldaulactone ont

également été mis en évidence dans ce cluster. Il s'agit d'une monooxygénase et d'une méthyltransférase (Fig. 3).

Une voie de biosynthèse a alors été proposée (Fig.4). Un tricétide réduit est produit par la PKS réductrice AdPKS7. L'addition de quatre unités malonyl-CoA est ensuite catalysée par les domaines AT, KS et SAT de la PKS non réductrice AdPKS8. Le noyau benzène est formé par condensation de l'aldol en C3 et C8 grâce au domaine PT de l'AdPKS8. La macrolactone est cyclisée grâce au domaine TE d'AdPKS8. Enfin, la monooxygénase catalyse l'ajout d'une fonction alcool en C6 qui est ensuite méthylée par la méthyltransférase.

C. Problématique et objectif du stage

Ce stage s'inscrit au sein du projet AldauTox, dans la continuité des travaux de Julia Courtial (2019) et dans la thèse de Jérôme Monroe Bernardino (en cours) sur la voie de biosynthèse de l'aldaulactone, mais aussi des travaux de précédents stagiaires.

L'objectif de ce stage est de confirmer le rôle des quatre enzymes impliquées dans la voie de biosynthèse de l'aldaulactone grâce à la production de mutants d'insertion (KO pour *Knock Out mutants*) sur les gènes concernés. La transformation d'*A. dauci*, longtemps considéré comme impraticable, a été rendue possible grâce à l'adaptation d'un protocole de transformation d'*A. brassicicola* (Gadras, 2020).

Des mutants KO pour *AdPKS7*, *AdPKS8* et une région non codante (NC) proche d'*AdPKS7* ont déjà été créés lors de précédents stages : *AdPKS7ΔAT*, *AdPKS8ΔAT* et *AdPKS8ΔKS* par Maïwenn Gadras et *AdPKS7ΔKS* et *AdΔNC* par Elza Neau. Nous nous sommes proposés de compléter cette collection en produisant de nouveaux mutants KO pour la monooxygénase et la méthyltransférase du cluster 8 afin de pouvoir démontrer le rôle de chaque gène dans la biosynthèse de l'aldaulactone. Les mutants ont ensuite été caractérisés, en comparaison avec la souche sauvage, par leur capacité à produire de l'aldaulactone, évaluée grâce à une chromatographie liquide à haute performance (HPLC). La possibilité d'effets pléiotropes a aussi été étudiée par une analyse phénotypique des différentes souches, comprenant une mesure de croissance ainsi qu'une observation microscopique des conidies.

D'une part, cette caractérisation permettra de démontrer le rôle du cluster 8 dans la biosynthèse de l'aldaulactone. D'autre part, si la voie de biosynthèse proposée par Courtial *et al.* (2022) est juste, on s'attend à la production de composés intermédiaires, dont la sporostatine (Fig. 2, 4). L'étude de ces souches transformées permettra peut-être de connaître la nature et la toxicité de ces éventuels intermédiaires de biosynthèse.



II. MATÉRIELS ET MÉTHODES

A. Matériel fongique et milieux de culture

Une souche sauvage de référence FRA001 et cinq souches mutantes obtenues à partir de cette souche sauvage (AdPKS7ΔAT, AdPKS7ΔKS, AdPKS8ΔAT, AdPKS8ΔKS, AdΔNC) ont été utilisées durant ce stage. Elles ont été cultivées sur milieu V8 (200 mL de jus de légume V8® Campbell, 0,3 % p/v CaCO₃, 2 % agar bactériologique, qsp 1 L eau milliQ) à partir d'explants de souches plus anciennes, et stockées à 24°C à l'obscurité. Les différentes souches ont également été cultivées en culture liquide. Pour chaque souche, dix explants de mycélium d'environ 5 mm de diamètre ont été broyés pendant trente secondes avec 40 mL de PDB (Potato Dextrose Broth, Difco™). Le récipient de broyage a ensuite été rincé avec 60 mL de PDB pour récupérer les derniers morceaux de mycélium pour un volume final de 100 mL. L'échantillon a été incubé 72 h à 24°C à l'obscurité et sous agitation.

B. Analyse de la production d'aldaulactone des mutants déjà existants

1. Préparation des exsudats fongiques

Les cultures liquides incubées 72h à 24°C (voir Matériel et Méthode A) ont été filtrées successivement avec des filtres tissés en nylon Sefar Nitex (Sefar AG, Heiden, Switzerland) de 200 µm, 50 µm puis 1 µm. Les filtrats ont été ajustés à pH 7 avant d'être soumis à une extraction liquide-liquide qui a été réalisée avec de l'acétate d'éthyle, toujours ajouté à volume équivalent. L'opération a été répétée trois fois. Du sulfate de sodium a été ajouté à la phase organique, puis la phase organique a été filtrée avec du coton avant d'être placée sous pression à 40 °C (Rotavapor, valeur vide 270 mbar, hystérésis 30 mbar) afin d'évaporer l'acétate d'éthyle. L'extrait organique obtenu a été rincé avec de l'acétone avant d'être séché à l'azote. Il a ensuite été suspendu dans du méthanol qualité HPLC à 5 mg·mL⁻¹ et centrifugé 10 minutes à 11 000 g. Les exsudats fongiques ont ensuite été analysés par HPLC-UV. Trois répétitions techniques, avec trois répétitions biologiques pour chaque souche, ont été programmées.

2. HPLC-UV

L'analyse de la production d'aldaulactone des différents extraits fongiques a été effectuée par chromatographie liquide à haute performance (HPLC) avec un détecteur UV. Les exsudats ont été injectés sur colonne C18 (Uptisphere 120 Å, Liaison : ODB, particules 3 µm, Longueur : 150 mm, I.D. : 4,6 mm). La phase mobile était composée d'eau comme solvant A et de méthanol comme solvant B. Le gradient de solvant a débuté avec 90% du solvant A et 10% du solvant B à 0 minute, puis a été modifié pour obtenir 100 % de solvant B à 25 minutes. Il a été maintenu pendant 5 minutes avant de retrouver les conditions initiales (90% de solvant A, 1 minute) avec un rééquilibrage de 9 minutes. Le débit était de $0,7 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$.

C. Analyse phénotypique des mutants déjà existants

1. Mesure de la croissance mycéienne

Le taux de croissance de chaque souche a été mesuré sur boîte de Pétri. Un explant de taille égale pour chaque essai a été déposé sur milieu V8 au centre de la boîte. Le diamètre de la colonie a été mesurée à la règle tous les jours à partir de 3 jours, et jusqu'à 7 jours après le démarrage de la culture. L'aire sous la courbe de croissance (AUC) a été calculée en utilisant la formule suivante :

$$AUC = \sum_{j=4}^7 \frac{1}{2} (d_j + d_{j-1}) = (d_4 + d_5 + d_6) + \frac{1}{2} (d_3 + d_7)$$

Trois réPLICATIONS par souche ont été effectuées, et l'expérience a été répétée trois fois.

2. Analyse phénotypique des conidies

Les conidies des différentes souches ont été observées par microscopie après deux semaines de culture. 25 µL de suspension de conidies récupérés sur boîte ont été déposées sur une lame. L'observation a ensuite été réalisée grâce au microscope optique ZEISS Imager 7.2 équipé de la caméra AxioCam 305 Color, et l'acquisition d'image grâce au logiciel ZEN 3.3 (blue edition). Les images sont prises au grossissement $\times 20$. La longueur totale des conidies, la longueur de leur bec et la longueur de leur corps ont été mesurées grâce au logiciel ImageJ.

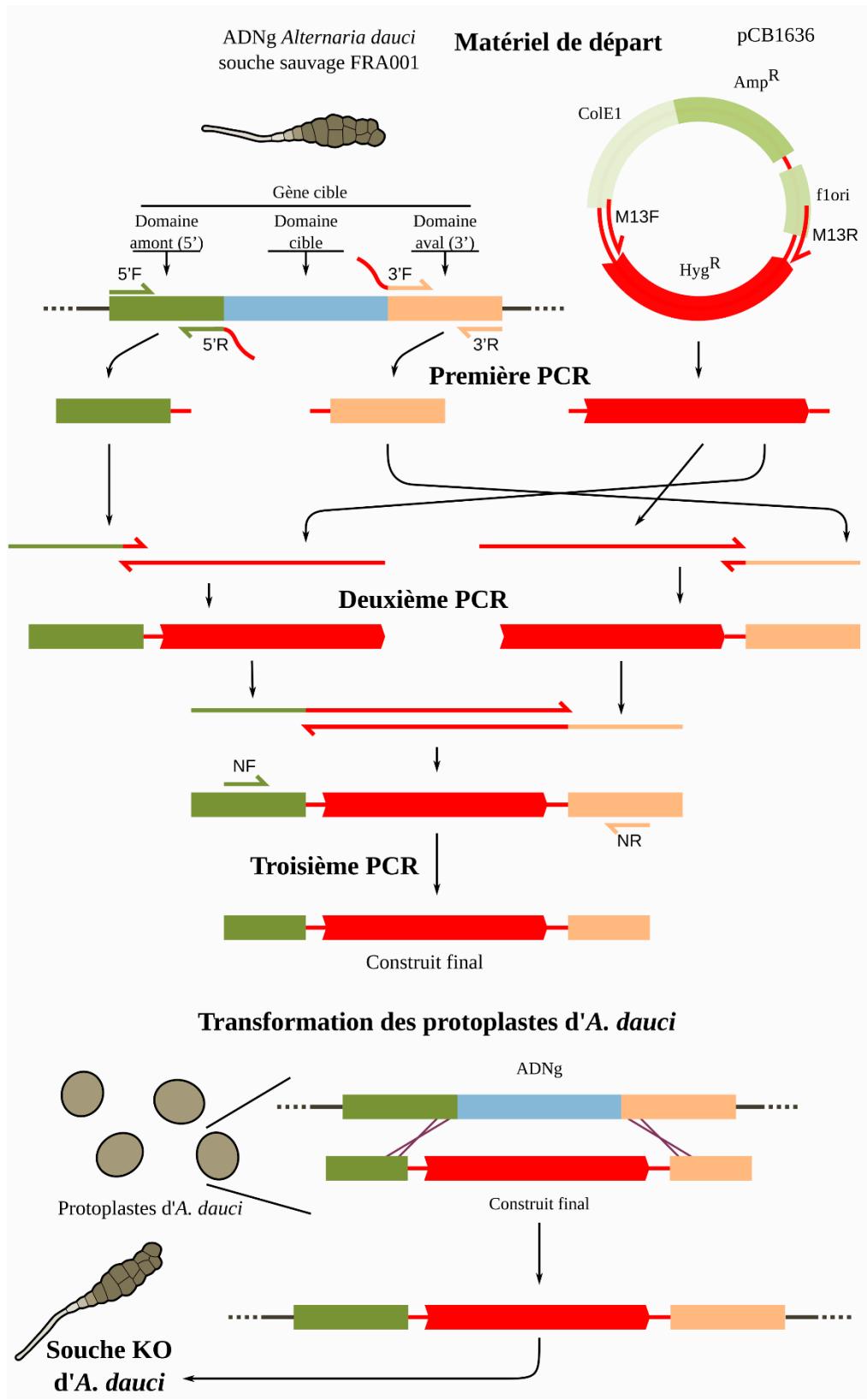


Figure 5 : Production de la cassette de résistance par PCR double-joint et transformation des protoplastes *Alternaria dauci*

La PCR 1 amplifie les trois constituants de la future cassette. La PCR 2 lie les trois constituants pour former la cassette de résistance. La PCR3 amplifie la cassette de résistance. L'intégration de la cassette de résistance à la place du gène cible se fait par recombinaison homologue dans le génome de protoplastes d'*A. dauci*.

3. Analyses statistiques

Les valeurs AUC ainsi que les valeurs des longueurs des conidies pour chaque souche ont été analysées sur RStudio, environnement du logiciel R (version 4.3.3). Une analyse de variance a été effectuée sur ces différentes données via un test ANOVA, accompagnée d'un test post-hoc de Tukey afin de déterminer où se situent les différences significatives révélées par le test ANOVA.

Un ratio entre la longueur du corps des conidies et la longueur de leur bec a également été calculé, sur lequel un test de Kruskal-Wallis suivi d'un test de Dunn a été effectué.

D. Création de mutants

L'obtention de mutants KO d'*A. dauci* se base sur l'intégration, par recombinaison homologue, d'une cassette de résistance à la place du gène ciblé dans le génome du champignon. Ici, les gènes ciblés sont ceux codant pour la méthyltransférase et la monooxygénase du cluster 8. La cassette de résistance est créée à partir d'un gène de résistance à l'hygromycine, le gène *Hph* qui code pour l'hygromycine B phosphotransférase, et des parties flanquantes 3' et 5' de la séquence d'ADN du gène à muter. Elle est obtenue grâce à la technique de PCR double-joint (DJ-PCR), technique développée par Yu *et al.* en 2004 (Fig. 5). La transformation se fait par transformation des protoplastes.

1. Extraction d'ADN

L'ADN génomique d'*A. dauci* est issu d'une souche sauvage FRA001. Il a été récupéré grâce à une extraction par micro-ondes selon le protocole développé par Goodwin et Lee (1993). Le protocole détaillé est présenté en Annexe I. Le gène de résistance à l'hygromycine provient du plasmide pCB1636 (LT726869 ; Sweigard *et al.*, 1997) et a été prélevé grâce au kit d'isolation de plasmide NucleoSpin® Plasmid (Macherey-Nagel).

2. DJ-PCR

La DJ-PCR consiste en une succession de trois PCR. Les mix de ces PCR ont été obtenus grâce aux produits du pack Phusion Hot Start II High-Fidelity DNA Polymerase (Thermofisher) et aux différentes amores nécessaires dessinées sur Primer3+ (Fig. 5, Annexe III).

Tableau 2 : Programmes utilisés pour la PCR double-joint

	PCR n° 1		PCR n° 2		PCR n° 3	
	Température	Temps	Température	Temps	Température	Temps
Dénaturation initiale	98°C	30 sec	x30	94°C	2 min	x 35
Dénaturation	98°C	10 sec		94°C	30 sec	
Hybridation	Tm des amorces	30 sec		58°C	10 min	
Elongation	72°C	30 sec		72°C	5 min	
Elongation finale	72°C	5 min		72°C	10 min	
Conservation	15°C	∞		15°C	∞	

Tm : *melting temperature* (température de fusion)

Tableau 3 : Programme utilisés pour la PCR de vérification de l'ADN des potentiels transformants

	Température	Durée
Dénaturation initiale	95°C	3 min
Dénaturation	95°C	30 sec
Hybridation	58°C	30 sec
Elongation	72°C	2 min 30 sec
Elongation finale	72°C	5 min
Conservation	15°C	∞

La première PCR a pour but d'amplifier les différents constituants de la cassette : la partie flanquante 5' du domaine cible, la partie flanquante 3' du domaine cible, et le gène *Hph*. Une fois les trois constituants amplifiés, les produits PCR obtenus ont été purifiés avec le kit NucleoSpin® PCR and gel Clean Up (Macherey-Nagel). L'amplification des différents constituants a été vérifiée par électrophorèse sur gel d'agarose 1,2% (p/v). La seconde PCR a permis de lier les trois constituant purifiés afin de produire la cassette de résistance. Enfin, la dernière PCR a amplifié la cassette obtenue. Les produits de la PCR finale ont également été purifiés à l'aide du kit NucleoSpin® PCR and gel Clean Up, et l'amplification a été vérifiée par électrophorèse sur gel d'agarose 1,2% (p/v). Les programmes utilisés pour chaque PCR sont présentés dans le Tableau 2.

3. Transformation de protoplastes

Les protoplastes ont été préparés à partir d'une préculture de conidies de la souche FRA001 d'*A. dauci* dans du PDB incubé pendant 16 h à 32 °C sur plateau rotatif. Une fois que les conidies ont commencé à germer, le mycélium a été centrifugé puis lavé avec du NaCl (0,7 M). Il a ensuite été digéré pendant 6 h dans une solution enzymatique composée de Driselase (Sigma D9515-5G, 20 mg·mL⁻¹), de Kitalase (Wako 1W114- 0037, 10 mg·mL⁻¹), et de NaCl (0,7 M). Les protoplastes ont ensuite été centrifugés et suspendus dans une solution de STC (1,2 M sorbitol, 10 mM Tris pH 7,5, 50 mM CaCl₂, eau milliQ) à une concentration idéale de minimum 10⁶ protoplastes·mL⁻¹. La cassette de résistance (ADN) a été ajoutée à la suspension de protoplastes qui a été incubée 20 minutes dans la glace. Une solution de PEG (6% p/v polyéthylène glycol MW3350 (Sigma-Aldrich P3640), 10 mM Tris pH 7,5, 50 mM CaCl₂, eau milliQ) a été ajoutée en plusieurs fois avec des périodes d'incubation dans la glace et de chauffage entre les mains. Les protoplastes sont incorporés dans le milieu de régénération (1 M saccharose, 0,1 % p/v extrait de levure, 0,1 % p/v caséine hydrolase et 1,6 % p/v agar bactériologique), et une surcouche d'eau gélosée mélangée à de l'hygromycine à 8 µg·mL⁻¹ a été ajoutée le lendemain. Le protocole détaillé est présenté en Annexe II.

Les potentiels transformants résistant à l'hygromycine B qui ont traversé la surcouche ont été prélevés et repiqués sur milieu PDA (Potato Dextrose Agar, Difco™) supplémenté d'hygromycine B à 5 µg·mL⁻¹. Ils ont ensuite été purifiés par monosporrage. Un faible nombre de conidies a été prélevé sur boîte puis étalé grâce à des billes stériles sur nouvelle boîte de PDA avec hygromycine à la même concentration.



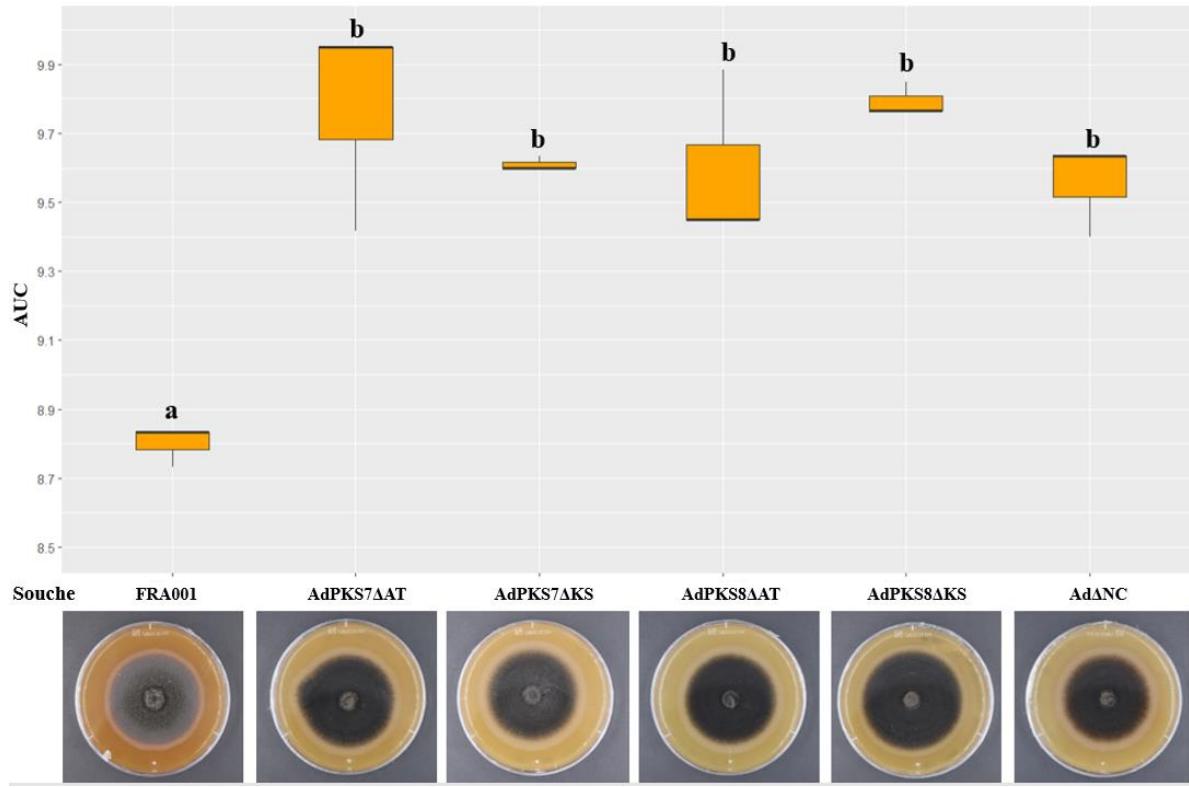


Figure 6 : Aire sous la courbe (AUC) et phénotype de la souche sauvage (FRA001) et des souches mutantes d'*Alternaria dauci* sur boîte

p < 0,05 (ANOVA, Tukey)

Pr = 0,79 (test de Levene)

NC : non codant

p-value = 0,65 (test de Shapiro)

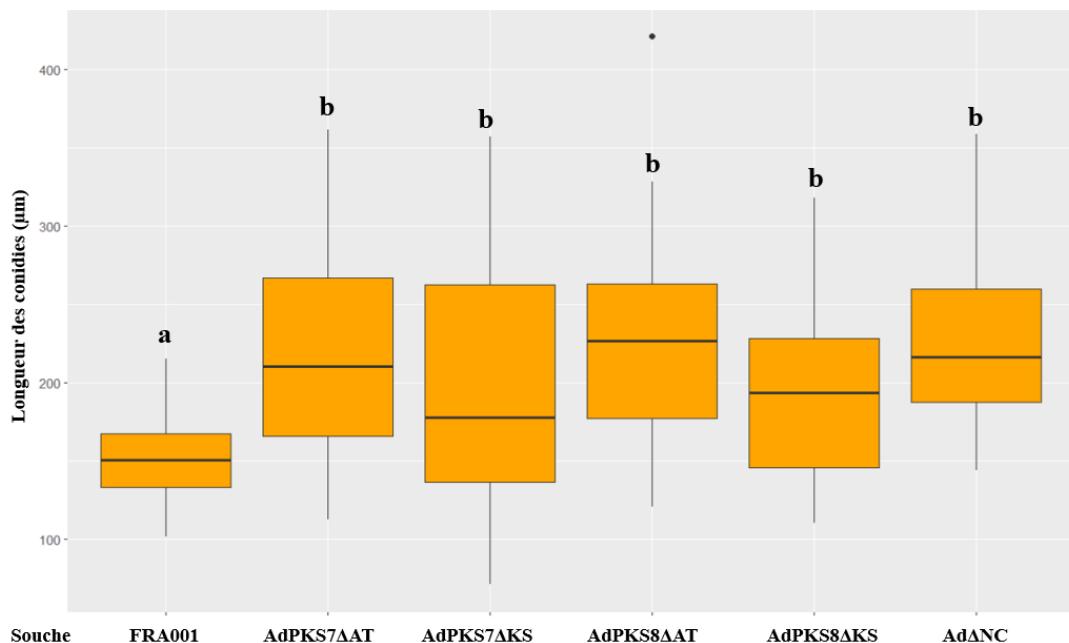


Figure 7 : Longueur des conidies de la souche sauvage (FRA001) et des souches mutantes d'*Alternaria dauci*

p < 0,05 (ANOVA, Tukey)

Pr = 1,609e⁻⁵ (test de Levene)

NC : non codant

p-value= 0,048 (test de Shapiro ; statistiques réalisées à partir des données normalisées grâce au test Box Cox, p-value = 0,9368)

4. Vérification de la transformation

Les potentiels transformants sont évalués par PCR sur la présence ou l'absence de la séquence génomique cible, à savoir le gène codant pour la méthyltransférase ou la monooxygénase du cluster 8, et la présence ou absence du gène de résistance à l'hygromycine. Pour ce faire, l'ADN des potentiels transformants a donc été extrait à partir du protocole décrit précédemment (Goodwin et Lee, 1993). La PCR a été réalisée dans un volume final de 25µL à l'aide de la polymérase GoTaq® G2 Hot Start Polymerase, suivant le programme présenté dans le Tableau 3. Les produits PCR ont été révélés par électrophorèse sur gel d'agarose 1,2% (p/v).

III. RÉSULTATS

A. Étude phénotypique des mutants préexistants

1. Croissance mycélienne

Pour la souche sauvage FRA001 et les cinq souches mutantes disponibles, une aire sous la courbe (AUC) a été calculée à partir des mesures de la croissance radiale des colonies (Fig. 6). Les AUC des différentes souches ont ensuite été comparées par analyse de variance suivie d'un test de Tukey. Une différence significative ($p < 0,05$) a été observée entre la valeur de l'AUC de la souche FRA001 et celles de toutes les souches mutantes. Chez FRA001, des AUC comprises entre 8,7 et 8,9 ont été mesurées, tandis que pour les mutants, on observe des AUC entre 9,4 et 10,0. Aucune différence entre souches mutantes n'a été observée, en particulier les AUC de la souche AdΔNC ne sont pas différentes de celles des autres souches mutantes.

D'autre part, plusieurs différences qualitatives ont été observées entre FRA001 et les différentes souches mutantes (Fig. 6). Le mycélium de la souche sauvage est légèrement plus clair, avec un aspect duveteux plutôt blanc en périphérie, tandis que les mycelia des souches mutantes sont plus sombres. Aussi, FRA001 diffuse dans le milieu un pigment orange absent chez les souches mutantes. Ici encore, il n'y a pas de différence entre la souche AdΔNC et les autres mutants.

2. Phénotype des conidies

Les conidies des différentes souches ont été observées au microscope afin de déterminer si les mutations avaient un impact sur leur phénotype. Pour chaque souche, la longueur totale

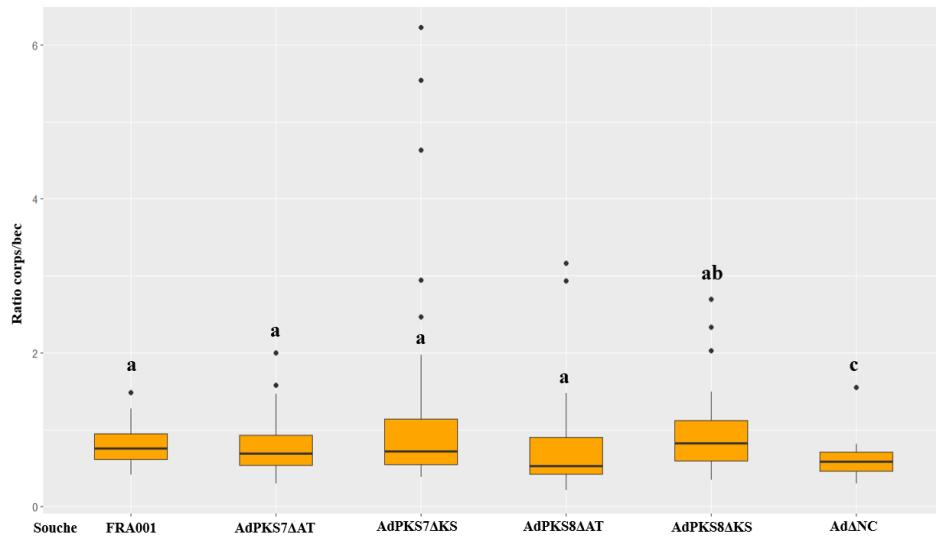


Figure 8 : Ratio de la longueur du corps sur la longueur du bec des conidies de la souche sauvage (FRA001) et des souches mutantes d'*Alternaria dauci*

p < 0,05 (Kruskal-Wallis, Dunn)

NC : non codant

Tableau 4 : Taux de conidies présentant une déformation pour chaque souche d'*Alternaria dauci*

Souches	FRA001	PKS7ΔAT	PKS7ΔKS	PKS8ΔAT	PKS8ΔKS	ΔNC
Taux de conidies présentant une déformation	0	0,325	0,433	0,364	0,410	0,343

Une centaine de conidies ont été observées pour chaque souche. Le nombre de conidies anormales sur le nombre de conidies total a été calculé pour obtenir ce taux.

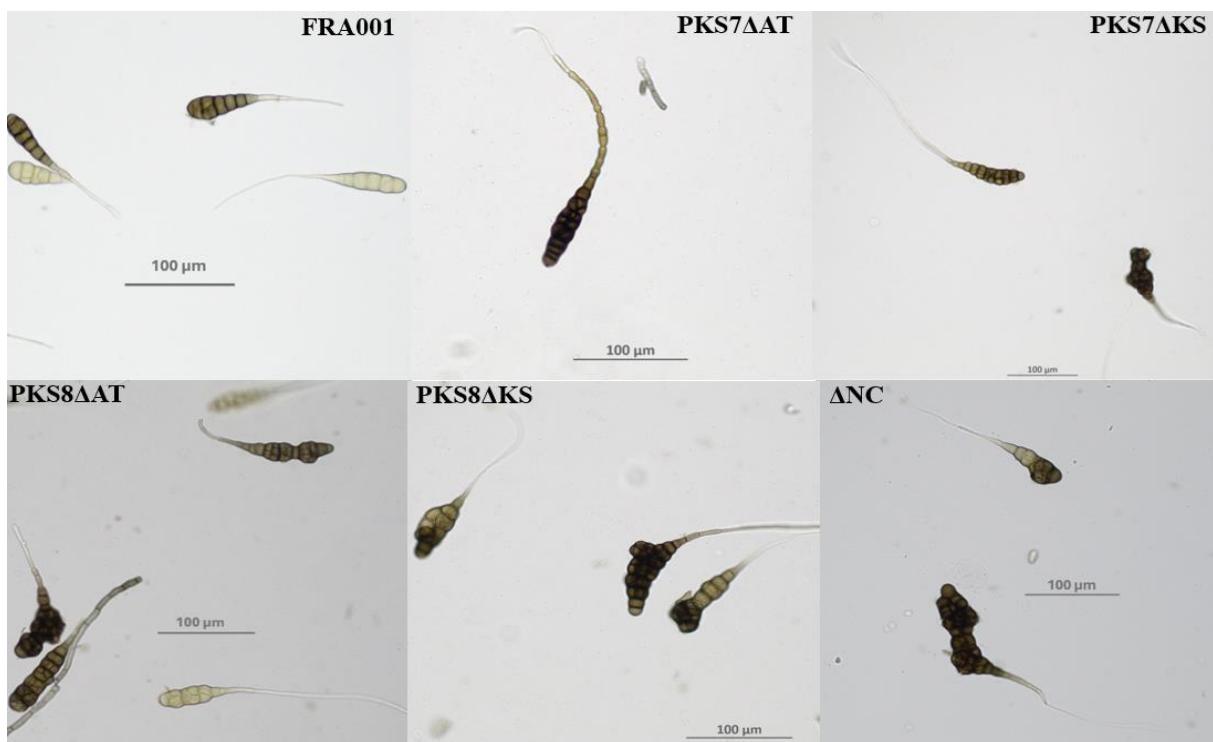


Figure 9 : Conidies de la souche sauvage (FRA001) et des souches mutantes d'*Alternaria dauci* observées au microscope optique, grossissement × 20

de 35 conidies prises aléatoirement a été mesurée (Fig. 7). L’analyse statistique (ANOVA suivie d’un test de Tukey) a montré les mêmes tendances que pour la croissance mycélienne : une différence significative ($p < 0,05$) entre la longueur des conidies issues de la souche sauvage FRA001 (autour des 150 μm) et celle des conidies issues des souches mutantes (autour de 200 μm ; Fig. 7). Pas de différence parmi celles-ci, en particulier entre Ad Δ NC et les autres mutants.

Un ratio de la longueur du corps sur la longueur du bec a aussi été calculé et analysé de la même façon (Fig. 8). Ce ratio est inférieur à un pour toutes les souches, ce qui signifie que de manière générale, le bec est plus long que le corps. Une différence significative entre le ratio de la souche FRA001 et celui de la souche Ad Δ NC est observé, ainsi qu’entre le ratio de la souche AdPKS8 Δ KS et celui de la souche Ad Δ NC qui est plus faible.

Ces mesures ont été l’occasion d’observer deux variations qualitatives. D’une part, une différence de coloration a également été observée entre les conidies sauvages et mutantes. Les conidies issues des souches mutantes sont généralement plus sombres que les conidies issues de la souche sauvage FRA001 (Fig. 9). Il a été également remarqué que de nombreuses conidies issues des souches mutantes présentaient des anomalies morphologiques, tant au niveau du bec qu’au niveau du corps. Les conidies issues de la souche sauvage présentent un bec filiforme de couleur claire, et un corps distinctement divisé en plusieurs compartiments par des cloisons transversales et des cloisons longitudinales, ce qui est conforme au type de l’espèce (Farrar *et al.*, 2004 ; Fig.9). Chez les mutants, certains becs présentent des « boursouflures » ou des compartiments cellulaires qui semblent être le prolongement du corps. Les corps possèdent régulièrement des « étranglements » ou au contraire des « excroissances » qui leur donnent un aspect déformé (Fig. 9). La proportion de conidies déformées a été évaluée sur l’observation d’une centaine de conidies (Tab. 4). Elle est comprise en 30 et 45% selon la souche considérée. Si la souche sauvage n’est pas prise en compte, ces différences de pourcentage ne sont pas significatives ($\chi^2=3,03$; ddl=4, $p=0,448$).

B. Détection de la production d’aldaulactone chez les mutants préexistants

La capacité de la souche sauvage FRA001 et des souches mutantes Ad Δ NC, AdPKS7 Δ AT, AdPKS7 Δ KS, AdPKS8 Δ AT et AdPKS8 Δ KS à produire de l’aldaulactone a été évaluée par HPLC-UV. Pour ce faire, des cultures liquides de ces souches ont été réalisées, puis la phase organique du filtrat de culture a été préparée par extraction liquide-liquide.

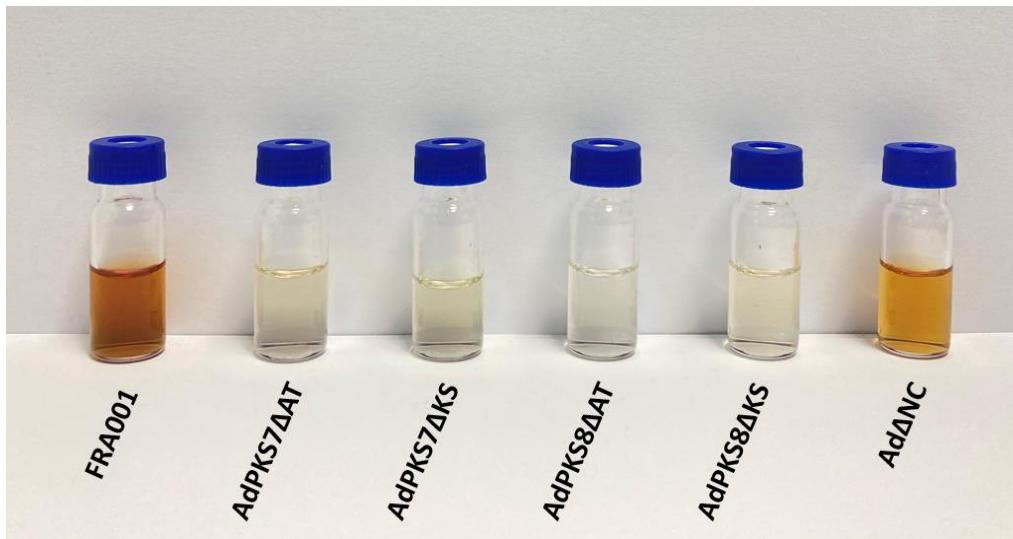


Figure 10 : Extraits organiques des souches d'*Alternaria dauci* analysés par HPLC-UV

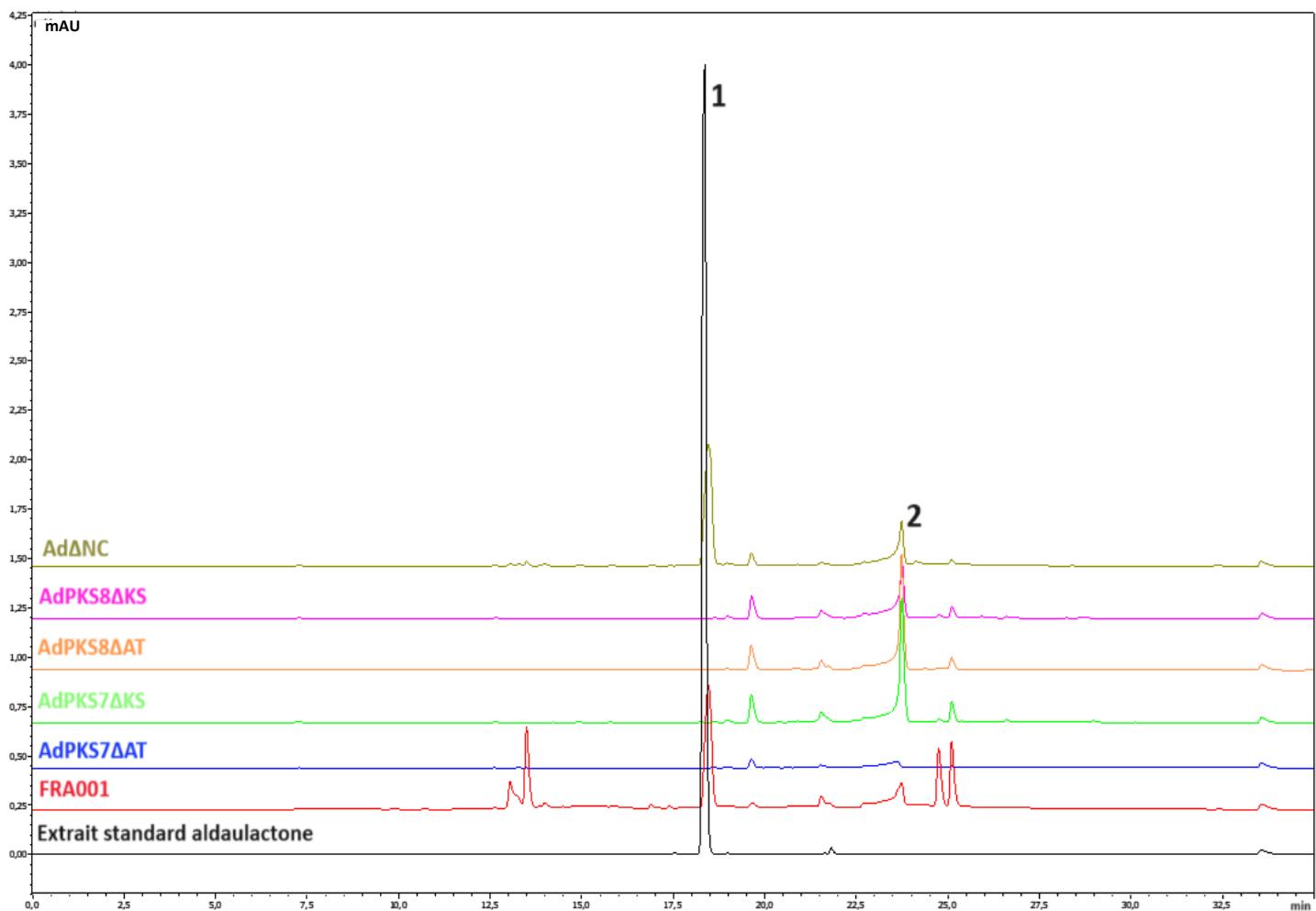


Figure 11 : Chromatogramme HPLC-UV (305 nm) des extraits organiques des milieux de cultures des souches d'*Alternaria dauci*, première répétition technique

Abscisse : Temps de rétention (en minutes) Ordonnée : Absorption (en mAU : milli absorbance unit ; donnée arbitraire)

1 : pic d'absorption correspondant à l'aldaulactone

2 : pic d'absorption correspondant à un composé à la nature encore inconnue

Une variation de la coloration de ces extraits fongiques a été observée en fonction de la souche considérée (Fig.10). En effet, l'extrait de la souche sauvage FRA001 présente une couleur tirant sur le rouge, couleur que l'on retrouve chez l'extrait du mutant Ad Δ NC en légèrement plus pâle. Tous les extraits des mutants PKS sont quant à eux quasiment incolores. Les extraits fongiques issus des souches mutantes et de la souche sauvage FRA001 ont ensuite été analysés par HPLC-UV à 305 nm, longueur d'onde qui correspond au maximum d'absorbance de l'aldaulactone. Le chromatogramme obtenu pour la première répétition technique est présenté en Fig. 11. Les pics majeurs d'absorption, correspondant à la présence de composés, ont été sélectionnés grâce à un seuil établi à 20% d'absorption observés au niveau du pic le plus élevé (Courtial *et al.*, 2018 ; Annexe IV).

L'extrait standard d'aldaulactone présente un unique pic d'absorption pour un temps de rétention de 18,5 minutes correspondant à l'aldaulactone. L'extrait fongique issu de la souche de référence FRA001, présente aussi un pic d'absorption largement majoritaire pour un temps de rétention de 18,5 minutes. Le pourcentage d'absorption est supérieure à 20%, démontrant que ce pic correspond bien à un composé et non à un bruit de fond. Ce pic d'absorption est similaire à celui obtenu avec l'extrait standard d'aldaulactone. Ce pic d'absorption correspond bien à la molécule d'aldaulactone. La souche sauvage produit donc bien de l'aldaulactone. Ce pic est également retrouvé chez le mutant Ad Δ NC.

Les profils HPLC obtenus pour les différents mutants sont ensuite analysés. Il est rapidement observé qu'aucun pic pour un temps de rétention de 18,5 minutes n'est présent pour les mutants AdPKS7 Δ AT, AdPKS7 Δ KS, AdPKS8 Δ AT, et AdPKS8 Δ KS. Ces résultats impliquent l'absence de production d'aldaulactone par les mutants, et donc le rôle des enzymes PKS7 et PKS8 dans la biosynthèse de cette toxine.

Il est cependant intéressant de noter qu'un autre pic, pour un temps de rétention d'environ 23,7 minutes, est présent sur le profil de toutes les souches mutantes. Le pourcentage d'absorption de ces pics étant supérieur à 20% (Annexe IV), ces pics révèlent bien la présence d'un composé différent de l'aldaulactone produit par ces souches.

C. Obtention de nouveaux mutants KO

La création de mutants KO repose sur la transformation de protoplastes, méthode adaptée avec succès (Gadras, 2020) à partir d'un protocole utilisé sur *Alternaria brassicicola*.

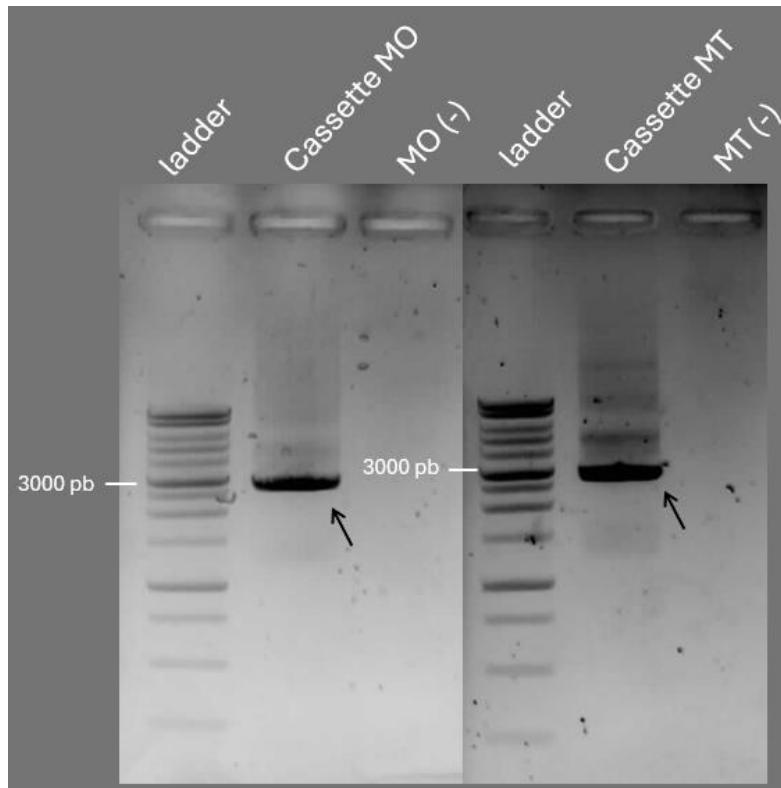


Figure 12 : Gels d'électrophorèse (agarose 1.2%) des produits PCR correspondant à l'amplification des cassettes de résistance

Ladder : marqueur de taille 1kb (kilo paire de bases)

Cassette MO : cassette de résistance pour le gène cible codant la monooxygénase

Cassette MT : cassette de résistance pour le gène cible codant la méthyltransférase

MO(-) : témoin pour la cassette MO MT(-) : témoin pour la cassette MT

Taille de la cassette MO : 2896 pb Taille de la cassette MT : 2923 pb

La première étape consiste en la production de cassettes de résistance par DJ-PCR. La bonne amplification des cassettes pour le gène codant pour la méthyltransférase (MT) et celui codant pour la monooxygénase (MO) a été vérifiée par électrophorèse sur gel d'agarose (Fig.12). La taille des amplicons attendus étaient de 2923 pb pour la cassette MT, et 2896 pb pour la cassette MO. Pour chaque gène, une bande épaisse est visible légèrement sous la barre de l'échelle correspondant à 3000 pb, témoignant d'une bonne amplification de ces deux cassettes.

Plusieurs essais de transformation ont été effectués. Les premiers n'ont fourni aucun transformant. Certains paramètres de la manipulation ont alors été ajustés afin d'obtenir un meilleur résultat, à commencer par l'obtention d'une concentration de protoplastes suffisante (supérieure à 10^6 protoplastes·mL⁻¹). Le temps d'incubation des précultures des conidies a par la suite lui aussi été augmenté à 16h au lieu de 15h. À la suite de ces deux modifications, le dernier essai de transformation de protoplastes a donné des résultats positifs.

En effet, quelques potentiels transformants ont réussi à percer la surcouche d'eau gélosée supplémentée d'hygromycine. Néanmoins, le nombre de ces potentiels transformants reste faible. De plus, les rares colonies potentiellement transformées se développent très lentement (Fig.13), puisqu'elles ne font que quelques millimètres de diamètre après quinze jours d'incubation à 24°C à l'obscurité.

Les potentiels transformants ont été monosporés sur un milieu PDA supplémenté en hygromycine au bout de quinze jours. Une seule colonie pour les potentiels mutants MO et plusieurs colonies potentiellement mutées sur la MT se sont développées. La croissance est encore une fois assez lente. Les champignons monosporés sur PDA se sont quant à eux développés très rapidement (Fig. 13).

Une extraction d'ADN et une PCR ont été réalisées pour vérifier la présence de la cassette de résistance et l'absence du gène codant pour la méthyltransférase. L'analyse de ces PCR par électrophorèse est présentée en Fig. 14. Sur les deux gels, une bande bien nette visible aux alentours des 550 pb révèle la présence de l'Internal Transcribed Spacer (ITS), prouvant que l'ADN fongique a bien été amplifié. Une bande est également observée aux alentours des 1700 pb sur les deux gels, correspondant au gène de résistance à l'hygromycine, suggérant que la cassette de résistance a bien été intégrée dans le génome fongique. En revanche, une bande, très faible, se distingue sur le gel A, indiquant la présence, même minime, du gène cible codant la méthyltransférase. La même vérification pour le gène codant la monooxygénase n'a pu être menée (gel B) puisque les amorces nécessaires ne sont pas valides.

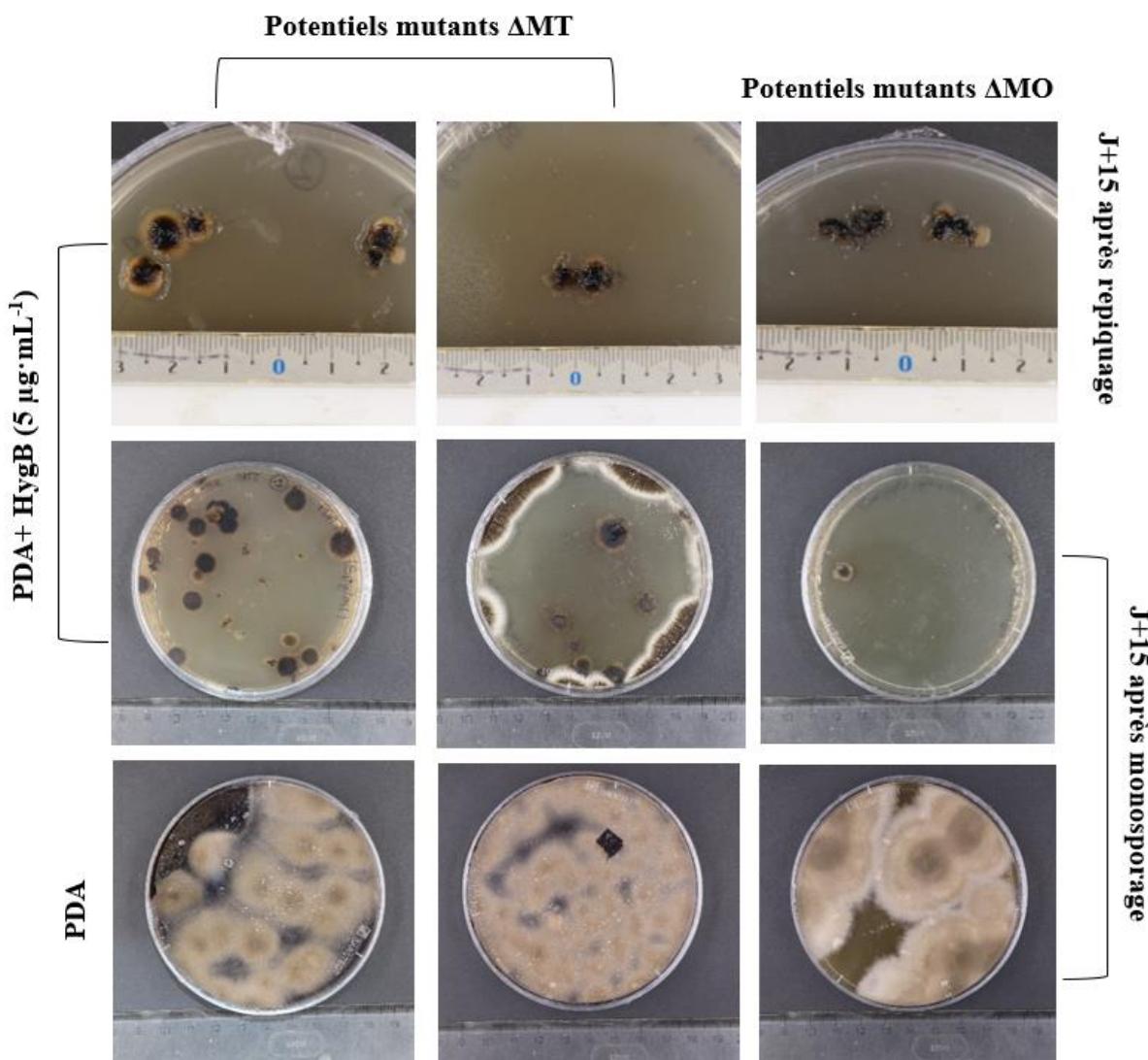


Figure 13 : Observation sur boîte des potentiels mutants Δ MT et Δ MO

Les potentiels transformants Δ MT et Δ MO ont été photographiés après 15 jours de développement (J+15) à la suite d'un repiquage ou d'un monosporage, sur un milieu PDA et sur un milieu PDA supplémenté d'hygromycine

IV. DISCUSSION

A. Effets dus à la transformation

Les phénotypes des souches transformées Ad Δ NC, AdPKS7 Δ AT, AdPKS7 Δ KS, AdPKS8 Δ AT et AdPKS8 Δ KS ont été évalués sur différents critères : aspect et vitesse de croissance du mycélium, aspect, couleur, taille et forme des conidies.

Les analyses statistiques réalisées sur les valeurs de l'AUC ont mis en avant une différence significative de croissance entre les souches mutantes et la souche sauvage (Fig.6). Les souches mutantes se développent plus rapidement que la souche sauvage sur milieu V8. La distinction entre les souches mutantes et la souche sauvage ne se limite pas à la croissance mycélienne, mais comprend également la longueur des conidies qui est significativement plus importante chez les mutants (Fig.7). Il a également été remarqué que 30 à 40 % des conidies issues des souches mutantes présentaient des anomalies morphologiques qui sont totalement absentes chez les conidies issues de la souche sauvage FRA001 (Tab. 4). Enfin, les conidies des souches mutantes semblent plus mélanisées que les conidies sauvages (Fig. 9).

Pour tous ces différents paramètres, la même tendance a été observée : les souches transformées présentent des différences avec la souche sauvage, et ces différences sont les mêmes, quelle que soit la transformation, y compris pour l'insertion du gène de résistance à l'hygromycine dans une région non codante du génome. Des effets pléiotropes, qui seraient imputés à la mutation en tant que telle, seraient éventuellement observés chez les mutants dont les gènes codant pour les PKS sont inactivés. Or, ces différences phénotypiques sont observées chez tous les mutants, dont le mutant Ad Δ NC.

Il a également été noté plusieurs fois que la production d'un mutant KO peut entraîner comme effet pléiotrope une altération de la production de mélanine, comme pour le mutant KO sur une PKS de *Coniothyrium minitans* (Luo *et al.*, 2018), ou le mutant KO sur la PKS7 d'*A. brassicicola* qui montrait une déficience en mélanine (Kim, 2009). Mais, dans le cas des mutants KO présentés dans cette étude, les conidies de tous les mutants ainsi que leur mycélium sont plus sombres que ceux de la souche sauvage, suggérant au contraire une concentration de mélanine plus importante. Aucune analyse n'a cependant été menée durant cette étude, il serait donc intéressant de comparer la concentration et/ou la production de mélanine des différents mutants avec la souche sauvage.



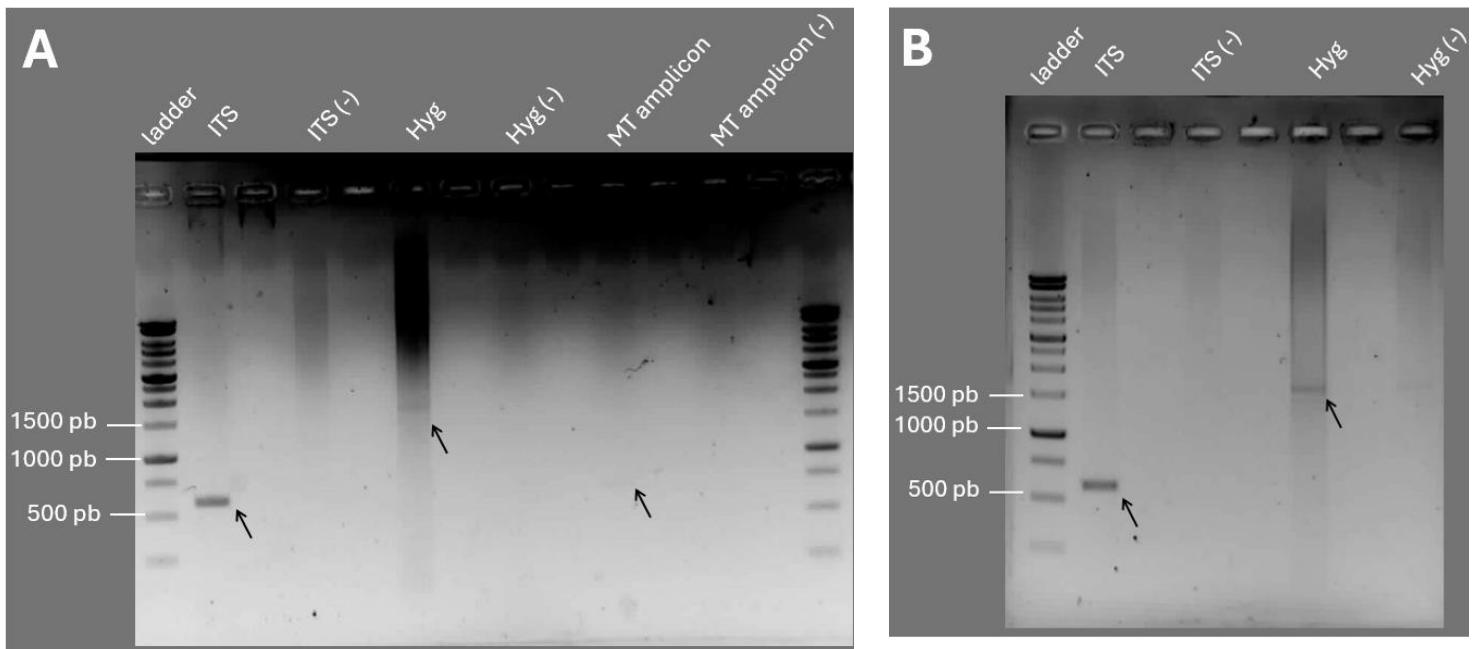


Figure 14 : Gels d'électrophorèse (agarose 1,2%) de vérification des produits PCR des potentiels transformants sur le gène codant la méthyltransférase (A) et des potentiels transformants sur le gène codant la monooxygénase (B)

Ladder: marqueur de taille 1 kb (kilo paire de bases) pb : paire de bases ITS : Internal Transcribed Spacer (amorces 3059/3338) Hyg : Gène de résistance à l'hygromycine (amorces 1606/1607) MT amplicon : séquence génomique du gène codant pour la méthyltransférase (amorces 3503/3504)

Taille de l'amplicon ITS : 550 pb

Taille de l'amplicon Hyg : 1696 pb

Taille de l'amplicon MT : 647 pb

La séquence génomique du gène codant pour la monooxygénase n'a pas été vérifiée car le couple d'amorces correspondant (3519/3520) n'est pas valide.

Toutes ces souches mutantes ont en commun l'insertion du gène de résistance à l'hygromycine. On pourrait suspecter que ce gène soit responsable des variations phénotypiques observées, mais cela n'a pas été le cas dans d'autres études. L'autre possibilité, est que c'est le passage par le stade protoplaste ou la sélection par l'hygromycine qui soit responsable de cet état de fait. En effet, le mycélium des champignon du genre *Alternaria* est un syncytium, contenant différents noyaux, potentiellement différents les uns des autres à la suite de mutations spontanées en culture. On peut imaginer que l'étape de transformation modifie l'équilibre entre ces noyaux et que cela agit sur le phénotype. Par exemple, la souche transformée provient peut-être d'un seul événement de transformation, ce qui évince tous les autres noyaux du syncytium, certains potentiellement porteurs d'allèles responsables de différences phénotypiques observées.

Une dernière différence entre les souches a été relevée, mais cette dernière semble liée à la capacité de la souche à produire de l'aldaulactone. En culture liquide, la souche sauvage FRA001 et la souche mutante Ad Δ NC présentent un milieu de culture orange sombre tirant sur le rouge, couleur que l'on retrouve chez les extraits organiques utilisés pour la HPLC (Fig. 10). Au contraire, les milieux de culture des mutants AdPKS7 Δ AT, AdPKS7 Δ KS, AdPKS8 Δ AT et AdPKS8 Δ KS sont plus pâles, tout comme la couleur de leurs extraits organiques. Il semble donc y avoir une corrélation entre la production d'aldaulactone et la couleur orange des exsudats fongiques. Certains polycétides sont des pigments utilisés dans l'industrie alimentaire comme colorants naturels, comme les azaphilones (Liu et Wang, 2021), mais cela n'est pas le cas actuellement pour les benzènediol lactones, famille distincte. De plus, l'aldaulactone pure est un solide amorphe de couleur jaune clair (Courtial *et al.*, 2018), il est donc très peu probable que l'aldaulactone soit un pigment conférant la couleur orange foncé décrite précédemment. Une hypothèse serait que l'atome d'oxygène présent dans l'hétérocycle macrolactone subisse des réactions d'oxydation. Cette hypothèse est appuyée par la similitude avec les flavonoïdes qui possèdent également un hétérocycle doté d'un atome d'oxygène : ils virent au rouge lorsque ce dernier s'oxyde au contact d'un pH acide. Ces réactions dépendraient donc du pH du milieu. Une analyse du pH pourrait être réalisée pour infirmer cette hypothèse ou la renforcer pour mener à une étude plus approfondie de la corrélation entre la couleur et l'aldaulactone. Cette hypothèse ne peut cependant se vérifier pour la culture en milieu solide, puisque la souche Ad Δ NC, qui produit de l'aldaulactone, ne confère pas à son milieu cette couleur orangée (Fig.6).



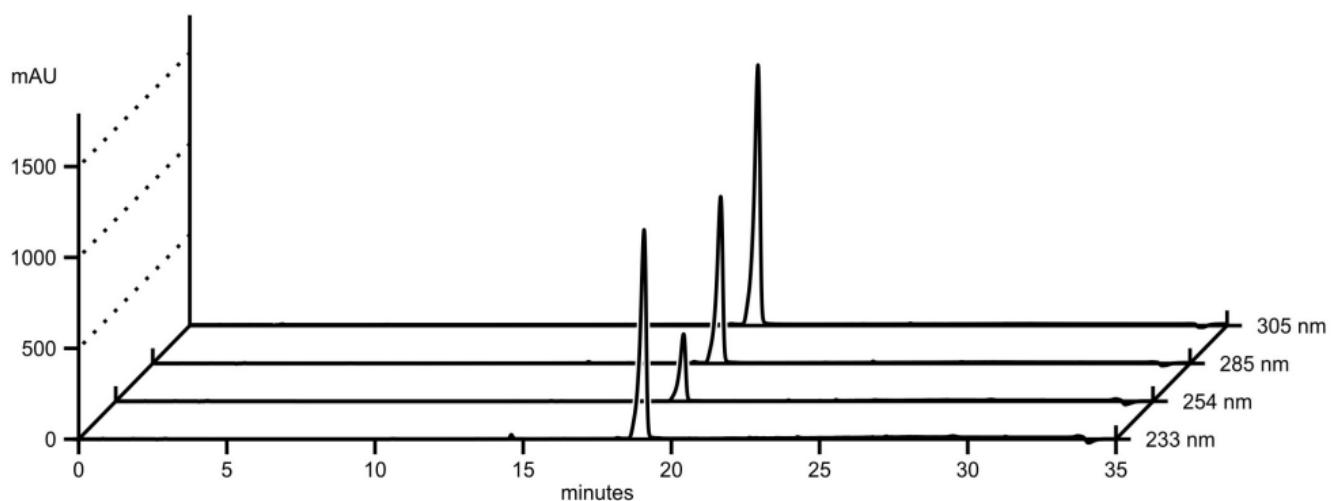


Figure 15 : Analyse de l’aldaulactone purifiée par HPLC-DAD à quatre longueurs d’ondes différentes (Courtial *et al.*, 2018)

mAU : milli absorbance unit (unité arbitraire)

Le pic présent sur le chromatogramme aux différentes longueurs d’onde correspond à l’aldaulactone purifiée

B. Abolition de la production d’aldaulactone

Les chromatogrammes obtenus par HPLC-UV à 305 nm ont montré la présence d'un pic d'absorption pour un temps de rétention de 18,5 minutes chez la souche sauvage FRA001, pic que l'on retrouve également pour l'extrait standard d'aldaulactone, révélant la présence d'aldaulactone pour cette souche (Fig.11). Ces résultats sont cohérents avec ceux établis lors de la caractérisation de la molécule (Courtial *et al.*, 2018 ; Fig. 15), prouvant alors la capacité de cette souche à produire l'aldaulactone. De même, pour le mutant Ad Δ NC , un pic d'absorption de la même intensité apparaît au même temps de rétention. La souche mutante transformée sur une région non codante, proche du gène AdPKS7, a donc toujours la capacité de produire de l'aldaulactone. Même si l'insertion du gène de résistance à l'hygromycine a provoqué des différences de phénotype entre souches sauvages et transformées, elle n'affecte pas la production d'aldaulactone.

À l'inverse, l'absence de pic chez les mutants AdPKS7 Δ AT, AdPKS7 Δ KS, AdPKS8 Δ AT et AdPKS8 Δ KS démontre une incapacité de ces souches à produire de l'aldaulactone. Cette abolition de la production d'aldaulactone pour ces mutants confirme le rôle des enzymes PKS7 et PKS8 dans la biosynthèse de la toxine fongique. La production d'aldaulactone n'est pas inactivée par la présence d'une cassette de résistance à l'hygromycine, mais bien par l'absence des gènes PKS qui ont été remplacés. Les enzymes PKS7 et PKS8 jouent donc effectivement un rôle central dans la biosynthèse de l'aldaulactone.

Ces résultats rappellent ceux obtenus avec la zéaralénone chez *Gibberella zeae* (Kim *et al.*, 2005). En effet, l'inactivation des gènes *PKS13* et *PKS4*, les deux polycétides synthases impliquées dans la voie de biosynthèse de la zéaralénone, corrèle avec l'absence de production de la toxine.

Enfin, un pic d'absorption pour un temps de rétention d'environ 23,7 minutes a été révélé sur le chromatogramme des souches mutantes AdPKS7 Δ AT, AdPKS7 Δ KS, AdPKS8 Δ AT et AdPKS8 Δ KS. Ce pic peut correspondre à un composé précurseur de la voie de biosynthèse. En effet, ce pic est présent pour tous les mutants transformés sur le gène codant pour les PKS. Selon le modèle de voie de biosynthèse proposé par Courtial *et al.* (2022), les PKS interviennent au tout début de la voie de biosynthèse, il est donc peu probable que ce composé soit un intermédiaire de la voie de biosynthèse de l'aldaulactone. On peut aussi imaginer que ce pic d'absorption correspond à un autre métabolite, peut-être une autre toxine. L'abolition de la production d'aldaulactone chez ces souches mutantes pourrait favoriser la production d'autres

métabolites en rendant certains composés plus disponibles, comme l'acétyle CoA et le malonyl CoA qui servent à la synthèse de polycétides. Cette hypothèse est appuyée par le fait que ce pic d'absorption, ayant un pourcentage d'absorption inférieur à 20% pour la souche FRA001 et la souche AdΔNC (Annexe IV), est non significatif pour ces deux souches qui produisent toutes les deux de l'aldaulactone.

C. Nouvelles transformations d'*A. dauci*

Les potentiels mutants obtenus ont un développement très lent sur milieu supplémenté d'hygromycine (Fig.13), impliquant une faible résistance à l'antibiotique.

Ce phénotype défavorable nous a d'abord fait penser à un échec de la transformation, la croissance observée ne correspondant pas à des transformants mais à des variants spontanés légèrement résistants à l'hygromycine. Dans l'hypothèse d'un échec de la transformation, plusieurs hypothèses peuvent être proposées.

La production de protoplastes viables est cruciale pour obtenir des transformants. Cependant, les étapes de digestion ne sont probablement pas à mettre en cause. En effet, les protoplastes obtenus sont en quantités suffisantes (plus de 10^6 protoplastes·mL $^{-1}$) et ils sont viables puisqu'ils se développent correctement dans le milieu de régénération sans la surcouche d'hygromycine. Le milieu de régénération lui-même ne peut d'ailleurs pas être mis en cause pour la même raison.

L'autre possibilité est la quantité et la qualité de l'ADN de la cassette. Ici, 20 µL d'ADN ont été utilisés pour réaliser la transformation, une quantité cohérente avec la littérature et avec les travaux antérieurs (Gadras, 2020 ; Neau, 2021). Cependant, lors de ces travaux, les concentrations obtenues à la suite de la purification des cassettes étaient aux alentours de 300 ng·µL $^{-1}$, contre 100 ng·µL $^{-1}$ ici. Ceci implique une dilution moins forte pour obtenir la même quantité d'ADN, et donc plus d'impuretés.

Pourtant, l'analyse de l'ADN de ces mutants potentiels montrent la présence de la cassette de résistance, suggérant que les potentiels transformants ont bien intégré la cassette (Fig.14). En revanche, le gène codant pour la méthyltransférase est également présent. Plusieurs hypothèses peuvent expliquer le présence de la cassette de résistance en même temps que du gène cible. Une première hypothèse repose sur l'intégration de la cassette de résistance à un autre endroit dans le génome. La spécificité des amorces et de la cassette devra donc être vérifiée. D'autre part, la cassette de résistance peut être très bien intégrée mais quelques noyaux



possèdent encore de l'ADN issu de la souche sauvage. Cela a déjà été observé pour d'autres transformations (Jérôme Bernardino, communication personnelle). Plusieurs monosporages seront donc nécessaires afin de ne sélectionner que les noyaux à l'ADN mutant résistant à l'hygromycine. A ce stade, on peut donc envisager la possibilité que, malgré leur phénotype défavorable, les souches obtenues soient les transformants recherchés. Il faut donc être capable d'expliquer leur phénotype sans faire l'hypothèse d'un échec de la transformation.

Une explication possible serait que la mutation favorise l'accumulation d'un composé毒ique pour le champignon. Dans le cas de la monooxygénase, le composé intermédiaire avant l'intervention de cette enzyme dans la voie de biosynthèse de l'aldaulactone est la sporostatine. Cette molécule est un inhibiteur de la phosphodiesterase, qui dégrade et régule l'AMP cyclique (Kinoshita *et al.*, 1997). L'accumulation de sporostatine implique une accumulation d'AMP cyclique qui pourrait avoir un effet毒ique pour le champignon. Cette hypothèse est cependant difficile à vérifier puisque l'AMP cyclique joue un rôle dans de très nombreuses voies de signalisation. La sporostatine est également une molécule qui ne diffère de la xestodécalactone que par la présence d'une double liaison (Yoshino *et al.*, 2006). La sporostatine partage donc peut-être les propriétés antifongiques de cette autre molécule. Cette hypothèse est cependant peu satisfaisante car les souches mutantes ne semblent pas présenter de phénotype délétère en absence d'hygromycine.

Une nouvelle transformation permettra de vérifier si le développement lent des potentiels mutants s'explique par la mutation ou par la transformation elle-même. Cette transformation inclura la création de mutants Ad Δ NC comme témoins positifs, la transformation de mutants Ad Δ NC ayant déjà réussi lors de précédents travaux (Neau, 2021). Si la transformation fonctionne normalement pour Ad Δ NC et que les potentiels transformants Δ MO et Δ MT ont toujours un développement tardif, alors cela renforcera l'idée que la mutations d'un de ces gènes induit de forts effets pléiotropes délétères.

V. CONCLUSION

Le présent travail s'inscrivait dans l'élucidation de la voie de biosynthèse de l'aldaulactone. Précédemment, il a été montré une corrélation entre production d'aldaulactone et agressivité d'*Alternaria dauci*, mais aussi une corrélation entre résistance à l'aldaulactone et résistance au champignon (Courtial *et al.*, 2018). Cette toxine semble donc jouer un rôle dans un cas de résistance quantitative, la résistance de la carotte face à *A. dauci*.

A partir d'une voie de biosynthèse hypothétique (Courtial *et al.*, 2022), des mutants KO ont été produits lors de précédents travaux, ciblant deux gènes codant pour des polycétides synthases (AdPKS7 et AdPKS8), ainsi qu'une région non codante. L'analyse phénotypique a montré des différences significatives de phénotype entre les souches mutantes et la souche sauvage, suggérant des effets dus à la transformation ou à la présence du gène de résistance à l'hygromycine. Une analyse HPLC a ensuite révélé l'incapacité des mutants PKS à produire de l'aldaulactone, démontrant l'implication de PKS7 et PKS8 dans la synthèse de l'aldaulactone.

Afin de pouvoir élucider la totalité de la voie de biosynthèse de l'aldaulactone, des transformations ont été menées afin d'obtenir des mutants KO des gènes codant la méthyltransférase et la monooxygénase du cluster 8, les deux enzymes qui seraient responsables de la structure finale de l'aldaulactone. De potentiels transformants ont été obtenus, mais leur identité reste à confirmer.

VI. PERSPECTIVES

Si les potentiels transformants sont validés, la prochaine étape sera de caractériser leurs phénotypes ainsi que leurs exsudats. En particulier, la caractérisation de la sporostatine dans les exsudats des mutants Δ MO apporterait une démonstration encore plus complète de la voie de biosynthèse proposée, mais permettrait aussi de résoudre la configuration du carbone asymétrique de l'aldaulactone. Si la transformation n'a pas réussi, de nouveaux tests de transformation devront être réalisés en optimisant certains paramètres, comme la quantité d'ADN à intégrer dans les protoplastes.

En parallèle, des tests de pathogénicité ont également été menés avec la souche sauvage et les différents mutants afin de déterminer si l'absence d'aldaulactone a un impact sur le pouvoir pathogène d'*A. dauci*, ce qui confirmerait le rôle majeur de ce composé dans l'interaction *D. carota – A. dauci*. A plus long terme, les réactions de défense de la carotte face à ce composé pourraient aussi être étudiées, de façon différentielle entre les génotypes sensibles et résistants.



BIBLIOGRAPHIE

- Arai, K., Rawlings, B.J., Yoshizawa, Y., Vederas, J.C.** (1989) Biosyntheses of antibiotic A2611 1 B by *Penicillium turbatum* and dehydrocurvularin by *Alternaria cinerariae*: comparison of stereochemistry of polyketide and fatty acid enoyl thiol ester reductases. *Journal of the American Chemical Society* **111**, 3391-3399.
- Bauerfeind, J.C.** (1972) Carotenoid vitamin A precursors and analogs in foods and feeds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **20**, 456–473.
- Ben-Noon, E., Shtienberg, D., Shlevin, E., Vintal, H.** (2001) Optimization of chemical suppression of *Alternaria dauci*, the causal agent of Alternaria Leaf Blight in carrots. *Plant Disease* **85**(11), 1149-1156.
- Boedo C, Benichou S, Berruyer R, Bersihand S, Dongo A, Simoneau P, Lecomte M, Briard M, Le Clerc V, Poupart P.** (2012) Evaluating aggressiveness and host range of *Alternaria dauci* in a controlled environment. *Plant Pathology* **61**, 63–75.
- Boedo, C., Berruyer, R., Lecomte, M., Bersihand, S., Briard, M., Le Clerc, V., Simoneau, P., Poupart, P.** (2010) Evaluation of different methods for the characterization of carrot resistance to the alternaria leaf blight pathogen (*Alternaria dauci*) revealed two qualitatively different resistances. *Plant Pathology* **59**, 368–375.
- Boedo, C., Le Clerc, V., Briard, M., Simoneau, P., Chevalier, M., Georgeault, S., Poupart, P.** (2008) Impact of carrot resistance on development of the alternaria leaf blight pathogen (*Alternaria dauci*). *European Journal of Plant Pathology* **121**, 55–66.
- Bounds, R.S., Hausbeck, M.K., Podolsky, R.H.** (2006) Comparing Disease Forecasters for Timing Fungicide Sprays to Control Foliar Blight on Carrot. *Plant Disease*, **90**(3), 264-268.
- Brandwag, B.F., Meshab, L.A., Takken, F.L.W., Laurent, P.L., Kneppers, T.J.A., Hille, J., Nijkamp, H.J.J.** (2000) A longevity assurance gene homolog of tomato mediates resistance to *Alternaria alternata f. sp. lycopersici* toxins and fumonisin B1. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **97**(9), 4961-4966.
- Courtial, J., Helesbeux, J.J., Oudart, H., Aligon, S., Bahut, M., Hamon, B., N'Guyen, G., Pigné, S., Hussain, A.G., Pascoau, C., Bataillé-Simoneau, N., Collemare, J., Berruyer, R., Poupart, P.** (2022) Characterization of NRPS and PKS genes involved in the biosynthesis of SMs in *Alternaria dauci* including the phytotoxic polyketide aldaulactone. *Nature, Scientific Reports*, 12:8155.
- Courtial, J.** (2021) Pouvoir pathogène et résistance : implication des toxines dans l’interaction carotte-*Alternaria dauci*. Thèse de Doctorat Physiologie et biologie des organismes - populations - interactions. Université d'Angers, Angers, *HAL open sciences*, 233 p.
- Courtial, J., Hamama, L., Helesbeux, JJ., Lecomte, M., Renaux, Y., Guichard, E., Voisine, L., Yovanopoulos, C., Hamon, B., Ogé, L., Richomme, P., Briard, M., Boureau, T., Gagné, S., Poupart, P., Berruyer, R.** (2018) Aldaulactone-an original phytotoxic secondary metabolite involved in the aggressiveness of *Alternaria dauci* on carrot. *Frontiers in Plant Science*, **9**(502).

- Dugdale, L.J., Mortimer, A.M., Isaac, S., Collin H.A.** (2000) Disease response of carrot and carrot somaclones to *Alternaria dauci*. *Plant Pathology* **49**, 57-67.
- Farrar, J.J., Pryor, B.M., Davis, R.M.** (2004) Alternaria diseases of carrot. *Plant Disease* **88**(8), 776–784.
- Gadras, M.** (2020) Biosynthesis of aldaulactone, a fungal toxin involved in the pathogenicity of *Alternaria dauci*, the main causal agent of carrot leaf blight. Rapport de stage de Master en Biologie et AgroSciences, Université de Bordeaux, 23 p.
- Goodwin, D.C. et Lee, S.B.** (1993) Microwave miniprep of total genomic DNA from fungi, plants, protists, and animals for PCR. *Biotechniques* **15**(3): 438, 441-2, 444.
- Iorizzo, M., Senalik, D., Ellison, S., Grzebelus, D., Cavagnaro, P., Allender, C., Brunet, J., Spooner, D., Deynze, AV., Simon, P.** (2013). Genetic structure and domestication of carrot (*Daucus carota subsp. sativus*) (Apiaceae). *American Journal of Botany* **100** 5, 930–8.
- Kim, K.H.** (2009) Functional analysis of secondary metabolite biosynthesis-related genes in *Alternaria brassicicola*. Mémoire de thèse de doctorat en Sciences de la Vie, Institut Polytechnique de Virginie, Blacksburg, 238 p.
- Kim, Y.T., Lee, Y.R., Jin, J., Han, K.H., Kim, H., Kim, J.C., Lee, T., Yun, S.H., Lee, Y.W.** (2005) Two different polyketide synthase genes are required for synthesis of zearalenone in *Gibberella zeae*. *Molecular Microbiology* **58**, 1102–1113.
- Kinoshita, K., Sasaki, T., Awata, M., Takada, M., Yaginuma, S.** (1997) Structure of sporostatin (M5032), an inhibitor of cyclic adenosine 3',5'-monophosphate phosphodiesterase. *The Journal of Antibiotics* **50**(11), 961-964
- Lawrence, D.P., Rotondo, F., Gannibal, P.B.** (2016) Biodiversity and taxonomy of the pleomorphic genus *Alternaria*. *Mycological Progress* **15**(1).
- Le Clerc, V., Pawelec, A., Birolleau-Touchard, C., Suel, A., Briard, M.** (2009) Genetic architecture of factors underlying partial resistance to alternaria leaf blight in carrot. *Theoretical and applied genetics* **118**, 1251–9
- Lecomte, M., Hamama, L., Voisine, L., Gatto, J., Helesbeux, J.J., Seraphin, D., Peña-Rodriguez, L.M., Richomme, P., Boedo, C., Yvanopoulos, C., Gyomlai, M., Briard, M., Simoneau, P., Poupart, P., Berruyer, R.** (2014) Partial resistance of carrot to *Alternaria dauci* correlates with in vitro cultured carrot cell resistance to fungal exudates. *PLoS ONE* **9**(7):e101008
- Liu, L., Wang, Z.** (2022) Azaphilone alkaloids: prospective source of natural food pigments. *Applied Microbiology and Biotechnology* **106**:469–484
- Luo, C., Zhao, H., Yang, X., Qiang, C., Cheng, J., Xie, J., Chen, T., Jiang, D., Fu, Y.** (2018) Functional analysis of the melanin-associated gene *CmMRI* in *Coniothyrium minitans*. *Frontiers in Microbiology* **9**, 2658–2658.
- Meeley, R.B. Walton, J.D.** (1991) Enzymatic detoxification of HC-toxin, the host-selective cyclic peptide from *Cochliobolus carbonum*. *Plant Physiology* **97**, 1080-1086
- Meena, M., Gupta, S.K., Swapnil, P., Zehra, A., Dubey, M.D., Upadhyay, R.S.** (2017) *Alternaria* toxins: potential virulence factors and genes related to pathogenesis. *Frontiers in Microbiology* **8**(1451).
- Neau, E.** (2021) Etude de la voie de biosynthèse de l’aldaulactone, toxine produite par l’agent fongique phytopathogène *Alternaria dauci* et impliquée dans son pouvoir pathogène. Rapport de stage de Master en Biologie Végétale, Université d’Angers, 68 p.

- Poland, J., Balint-Kurti, P., Wisser, R., Pratt, R., Nelson, R.** (2009) Shades of gray: the world of quantitative disease resistance. *Trends in Plant Science* **14** 1, 21–9.
- Qui, J.A., Castro-Concha, L.A., García-Sosa K., Miranda-Ham, M.L., Peña-Rodríguez, L.M.** (2010) Is zinniol a true phytotoxin? Evaluation of its activity at the cellular level against *Tagetes erecta*. *Journal of General Plant Pathology* **76** (2): 94-101.
- Rodriguez-Concepcion, M., Stange, C.** (2013) Biosynthesis of carotenoids in carrot: An underground story comes to light. *Biochemistry and Biophysics* **539**, 110-116
- Simon, P.W., Freeman, R.E., Vieira, J.V., Boiteux, L.S., Briard, M., Nothnagel, T., Michalik, B., et Kwon, Y.S.** (2008) Carrot. In Vegetables II: Fabaceae, Liliaceae, Solanaceae, and Umbelliferae, édité par Jaime Prohens et Fernando Nuez, 327-57. *Handbook of Plant Breeding*. New York, NY: Springer New York
- Stolarczyk, J., Janick, J.** (2011) Carrot: history and iconography. *Chronica Horticulturae* **51**, 13–18.
- Sweigard, J.A., Chumley, F., Carroll, A.** (1997) A series of vectors for fungal transformation. *Fungal Genetics Reports* **44**(19)
- Umesh, K.C., Davis, R.M., Gilbertson, R.L.** (1998) Seed contamination thresholds for development of carrot bacterial blight caused by *Xanthomonas campestris* pv. *Carotae*. *Plant Disease*, 1271-1275
- Urry, W.H., Wehrmeister, H.L., Hodge, E.B., Hidy, P.H.** (1966) The structure of zearalenone. *Tetrahedron Letters* **7**, 3109–3114.
- Yoshino, T., Ng, F., Danishefsky, S.J.** (2006) A total synthesis of xestodecalactone A and proof of its absolute stereochemistry: interesting observations on dienophilic control with 1,3-disubstituted nonequivalent allenes. *Journal of the American Chemistry Society* **128**, 14185-14191.
- Yu, J.H., Hamari, Z., Han, K.H., Seo, J.A., Reyes-Domínguez, Y., Scazzocchio, C.** (2004) Double-joint PCR: a PCR-based molecular tool for gene manipulations in filamentous fungi. *Fungal Genetics and Biology* **41**, 973–981.
- Zheng, L., Lv, R., Huang, J., Jiang, D.** (2010) Isolation, purification, and biological activity of a phytotoxin produced by *Stemphylium solani*. *Plant Disease*, 1231-1237.

Ministère de l’Agriculture, de l’Agroalimentaire et de la Forêt, arrêté du 12 mars 2014

SITOGRAPHIE

- [1] FAOSTAT, 2022 FAOSTAT <https://www.fao.org/faostat/en/#data>
- [2] AGRESTE, 2015 AGRESTE <https://agreste.agriculture.gouv.fr/agreste-web/>

ANNEXES

Annexe I : Protocole d'extraction d'ADN génomique de champignon par micro-ondes (d'après Goodwin and Lee, 1993)

- Prélever un échantillon de mycélium de 0,5cm² sur une culture solide et le placer dans un tube Eppendorf
- Ajouter 100 µL de tampon de lyse (50mM Tri-HCl pH=7,2, 50 mM EDTA, 3% SDS, 1% 2-mercaptopéthanol)
- Placer le reste du tampon de lyse au bain-marie à 80°C
- Placer l'échantillon au micro-ondes (max 850 W) avec bouchon ouvert pendant 12 sec, puis 8 sec, puis 3 sec (entre chaque chauffage, 5-10 sec de pause, soit 30 sec au total)
- Ajouter 300 µL de tampon de lyse sortant du bain-marie (volume total de 400 µL)
- Incuber les tubes (fermés + caps-locks) à 80 °C pendant 10 min
- Ajouter un volume équivalent (400 µL) d'un mélange phénol chloroforme-alcool isoamylque (25 :24 :1) et vortexer 15 sec
- Centrifuguer à 15 000 g pendant 15 min
- Récupérer la phase aqueuse (environ 350 µL) et la placer dans un nouveau tube
- Ajouter 10 µL d'acétate de potassium (5 M) et 180 µL d'isopropanol (0,5 volume)
- Incuber 5 min dans la glace
- Centrifuguer 10 min à 10 000 g
- Eliminer le surnageant et laver le culot dans 250 µL d'éthanol 80 %
- Centrifuguer 5 min à 10 000 g, puis éliminer le surnageant
- Sécher le culot au Speed-vac pendant 5 min
- Reprendre le culot dans 100 µL de TE (10 mM Tri-HCl, 0.1 mM EDTA, pH =8)

Annexe II: Protocole de transformation de protoplastes pour *Alternaria dauci*, adapté d'après le protocole de transformation de protoplastes pour *Alternaria brassicicola*

- Répartir la culture fongique dans 2 tubes de 50 mL. Centrifuger 10 min à 1 700 g sur centrifugeuse à nacelles. Centrifuger également la solution enzymatique composée de Driselase (Sigma D9515-5G, 20 mg·mL⁻¹), de Kitalase (Wako 1W114- 0037, 10 mg·mL⁻¹), et de NaCl (0,7 M).
- Pour la suspension fongique, éliminer le surnageant. Pour la solution enzymatique, éliminer le culot
- Pooler par 2 les tubes contenant la suspension fongique : verser environ 10-15 mL de NaCl (0,7 M) dans un des 2 tubes, suspendre le culot, verser l'ensemble dans le second tube et compléter à 30 mL avec du NaCl (0,7 M)
- Centrifuger les tubes 10 min à 1 700 g dans la centrifugeuse à nacelles
- Pendant les centrifugations, filtrer la solution enzymatique à l'aide de filtres 0,45 µm puis 0,20 µm à l'aide d'une seringue
- Eliminer le surnageant et resuspendre le culot dans 10 mL de NaCl (0,7 M)
- Centrifuger 10 min à 1 700 g dans la centrifugeuse à nacelles.
- Eliminer le surnageant et resuspendre le culot dans 20 mL de solution enzymatique.
- Incuber 32 °C pendant 6 h avec agitation manuelle toutes les 30 min
- Centrifuger 7 min à 1 700 g, collecter le surnageant
- Suspendre le culot avec grande précaution dans 1 mL de STC (1,2 M sorbitol, 10 mM Tris pH 7,5, 50 mM CaCl₂, eau milliQ). Compléter à 10 mL en rinçant les parois du tube
- Centrifuger 7 min à 1 700 g et jeter le surnageant
- Resuspendre doucement les protoplastes dans 500 µL de STC
- Dénombrer les protoplastes sur cellule de Thoma
- Aliquoter la suspension de protoplastes par 500 µL dans des tubes 15 mL
- Ajouter 20 µL de cassette (ADN) et mélanger par rolling avec précaution
- Incuber dans la glace pendant 20 min
- Ajouter du PEG (6% p/v polyéthylène glycol MW3350 (Sigma-Aldrich P3640), 10 mM Tris pH 7,5, 50 mM CaCl₂, eau milliQ) goutte à goutte sur les parois du tube : 200 µL, 200 µL puis 800 µL. Entre chaque ajout, chauffer le tube entre les mains et incuber 5 min dans la glace
- Ajouter doucement 1 mL de STC
- Mélanger par inversion 40 mL de milieu de régénération (1 M saccharose, 0,1 % p/v extrait de levure, 0,1 % p/v caséine hydrolase et 1,6 % p/v agar bactériologique) avec 500 µL de protoplastes (quantités pour couler 2 boîtes de Pétri)
- Laisser les boîtes refroidir puis les laisser, fermées, sous hotte jusqu'au lendemain
- Le lendemain, recouvrir avec 15 mL d'eau gélosée supplémentée d'hygromycine à 8 µg·mL⁻¹

Annexe III : Listes des amorces utilisées

N° amores	Nom	Séquence (5' → 3')	Utilisation
3338	ITS1	TCC GTA GGT GAA CCT GCG G	Contrôle de l'extraction d'ADNg
3059	ITS4	TTC TCC GCT TAT TGA TAT GC	Contrôle de l'extraction d'ADNg
1606	M13F	CAA CAT TGG CCA CCT GGA AG	Transformation de FRA001 ΔMT et ΔMO
1607	M13R	AAC GAC TTT CAG CAA ACC GC	Transformation de FRA001 ΔMT et ΔMO
3500	Ad-MT 5F	GCT GAAATC GTG CGA CCA TC	Transformation de FRA001 ΔMT
3501	Ad-MT 5R	<i>GTC GTG ACT GGG AAA ACC CTG GCG GAA ATG GTT CAG GAG TGA TCG ATG</i>	Transformation de FRA001 ΔMT
3502	Ad-MT NF	TAT GGG TTT CGG AAG TTG TCA GT	Transformation de FRA001 ΔMT
3503	Ad-MT IntF	ATG CTC TTC CAC ACG CTG AA	Vérification de la pureté de ΔMT
3504	Ad-MT IntR	CGA CAC CAC CCT CGT CAC	Vérification de la pureté de ΔMT
3505	Ad-MT 3F	<i>TCC TGT GTG AAA TTG TTA TCC GCT GGA GCC ATG TAG ACT TGC GA</i>	Transformation de FRA001 ΔMT
3506	Ad-MT NR	AAA GAT TGC GCA CAA ACC CC	Transformation de FRA001 ΔMT
3507	Ad-MT 3R	TCG CAC TCC ATA TGT ACG ACG	Transformation de FRA001 ΔMT
3516	Ad-MO 5F	AAA GAA AAG GGT AGC TCT CTG GG	Transformation de FRA001 ΔMO
3517	Ad-MO 5R	<i>GTC GTG ACT GGG AAA ACC CTG GCG ACA GGA CGT CAC TTA GTT TAA GAC T</i>	Transformation de FRA001 ΔMO
3518	Ad-MO NF	CCC TCC CTT TCG GCG TTT	Transformation de FRA001 ΔMO
3519	Ad-MO IntF	CAT GGG AGC GTG GTG TA	Vérification de la pureté de ΔMO
3520	Ad-MO IntR	TGA CGA CTA CAA TAG CGC CC	Vérification de la pureté de ΔMO
3521	Ad-MO 3F	<i>TCC TGT GTG AAA TTG TTA TCC GCT AGC TTT CGT GAG ATG CGC TA</i>	Transformation de FRA001 ΔMO
3522	Ad-MO NR	GCG CCA AGA CTT TGC TGT C	Transformation de FRA001 ΔMO
3523	Ad-MO 3R	AAT GCG GAG TGC TTT GGA GA	Transformation de FRA001 ΔMO

Rouge : amorces non valides

Annexe IV : Temps de rétention (min) et pourcentage d'absorption (%) de la HPLC pour les trois répétitions techniques

Souche	Répétition technique 1		Répétition technique 2		Répétition technique 3	
FRA001	18,455 min 29,364 %	23,738 min 10,064 %	18,404 min 31,442 %	23,415 min 4,366 %	18,391 min 20,136 %	23,671 min 12,062 %
PKS7ΔAT	18,589 min 0,400 %	23,613 min 39,464 %	18,608 min 0,217 %	23,745 min 44,696 %	18,391 min 1,258 %	23,616 min 29,048 %
PKS7ΔKS	18,606 min 0,462 %	23,739 min 52,071 %	18,598 min 0,178 %	23,736 min 51,605 %	18,586 min 0,401 %	23,547 min 25,400 %
PKS8ΔAT	18,602 min 0,405 %	23,729 min 57,059 %	18,657 min 0,144 %	23,744 min 30,329 %	18,574 min 0,499 %	23,526 min 28,474 %
PKS8ΔKS	18,613 min 0,628 %	23,749 min 43,211 %	18,342 min 1,474 %	23,438 min 18,0,81%	18,577 min 0,303 %	23,447 min 26,719 %
ANC	18,456 min 43,568 %	23,735 min 19,031 %	18,468 min 52,749 %	23,618 min 21,130 %	18,449 min 39,971 %	23,532 min 9,154%

Vert : pourcentage d'absorption supérieur à 20 %



Diplôme: Master
Mention : Biologie Végétale (BV)
Parcours : Plant and Health Protection

Auteur(s) : **Amandine RIGAUD**

Date de naissance* : 16/03/2000

Nb pages : 20 Annexe(s) : 4

Année de soutenance : 2024

Organisme d'accueil : IRHS, INRAE
Adresse : 42 rue Georges Morel, 49100
Maîtres de stage : Romain BERRUYER
Nelly BATAILLE-SIMONEAU

Titre français : Etude de la voie de biosynthèse de l'aldaulactone, toxine produite par le champignon nécrotrophe *Alternaria dauci*

Titre anglais : Study of the biosynthetic pathway of aldaulactone, a toxin produced by the necrotrophic fungus *Alternaria dauci*

Résumé (1600 caractères maximum) :

Les résistances quantitatives sont encore mal comprises mais constituent un intérêt pour le développement de plantes plus résistantes aux maladies. La résistance aux toxines fongiques fait partie des mécanismes possibles. Ces toxines sont des métabolites secondaires, déterminants majeurs du pouvoir pathogène des champignons nécrotropes. L'aldaulactone est une toxine produite par *Alternaria dauci*, et jouerait à la fois un rôle majeur dans le pouvoir pathogène, mais également dans la résistance quantitative de la carotte. L'étude de sa voie de biosynthèse est donc nécessaire afin de mieux comprendre les interactions au sein du pathosystème *Daucus carota - Alternaria dauci* qui est l'un des rares exemples de corrélation entre résistances quantitatives et toxines.

Ce présent travail a démontré l'implication de deux polycétides synthases, AdPKS7 et AdPKS8, dans la biosynthèse de l'aldaulactone. Une analyse HPLC a révélé l'incapacité de mutants KO pour ces deux gènes à produire de l'aldaulactone. Une analyse phénotypique a par ailleurs montré des effets de la transformation sur le phénotype, comme un développement plus rapide, des conidies plus longues et présentant parfois des dysmorphies, ainsi qu'une couleur plus sombre que la souche sauvage.

Les deux autres gènes potentiellement impliqués dans la voie de biosynthèse de l'aldaulactone, codant pour une méthyltransférase et une monooxygénase, ont fait l'objet d'un transformation afin de compléter le panel de mutants et d'élucider la totalité de la voie de biosynthèse. Ces mutants sont en cours de validation.

Abstract (1600 caractères maximum) :

Quantitative resistances are still poorly understood, but are of interest for the development of more disease-resistant plants. One of their mechanisms involves the resistance to toxins, fungal secondary metabolites that are major determinants of the pathogenicity of necrotrophic fungi. Aldaulactone is a toxin produced by *Alternaria dauci*, and is thought to play a major role in both pathogenicity and quantitative resistance in carrot. The study of its biosynthesis pathway is therefore necessary in order to better understand the interactions within the *Daucus carota - Alternaria dauci* pathosystem, which is one of the rare examples of correlation between quantitative disease resistances and toxins.

The present work demonstrated the involvement of two polyketide synthases, AdPKS7 and AdPKS8, in aldaulactone biosynthesis. HPLC analysis revealed the inability of KO mutants for these two genes to produce aldaulactone. Phenotypic analysis also showed the effects of transformation on the phenotype, such as faster development, longer, darker and sometimes deformed conidia than the wild-type strain.

The other two genes potentially involved in the aldaulactone biosynthetic pathway, coding for a methyltransferase and a monooxygenase, were transformed to complete the panel of mutants and elucidate the entire biosynthetic pathway. The validation of these mutants is underway.

Mots-clés : *Daucus carota*, *Alternaria dauci*, résistance quantitative, toxine, mutants KO

Key Words: *Daucus carota*, *Alternaria dauci*, quantitative resistance, toxin, KO mutants