

**2024-2025**

Master de biologie végétale

# **DEVELOPPEMENT D'UN OUTIL DE PHENOTYPAGE POUR ETUDIER LA SENSIBILITE D'ARABIDOPSIS THALIANA A ALTERNARIA BRASSICICOLA**

**ALEXANDRE BIGNON**

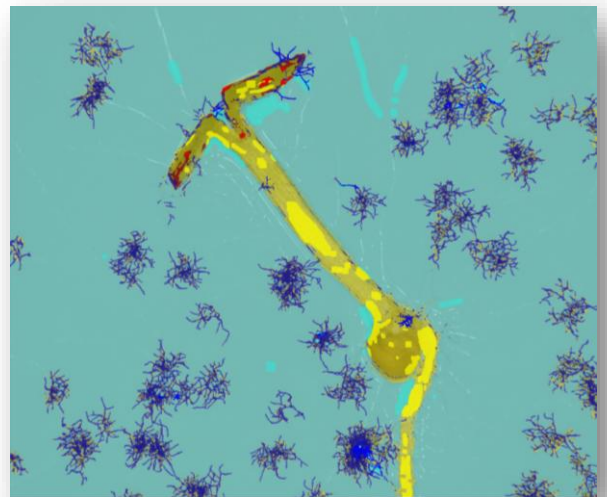
16/02/3003

Sous la direction de Christophe Veronesi

**STAGE REALISE A L'INSTITUT DE RECHERCHE EN  
HORTICULTURE ET SEMENCES (IRHS – UMR 1345)**

**DU 14 AVRIL 2025 AU 18 JUILLET 2025**

Maître de stage : Philippe Grappin



## **Jury**

Président : Philippe Simier

Directeur : Christophe Veronesi

Membre : Thomas Guillemette

Membre : Philippe Grappin

Soutenu publiquement le 1/07/2025





**2024-2025**

Master de biologie végétale

# **DEVELOPPEMENT D'UN OUTIL DE PHENOTYPAGE POUR ETUDIER LA SENSIBILITE D'ARABIDOPSIS THALIANA A ALTERNARIA BRASSICICOLA**

**ALEXANDRE BIGNON**

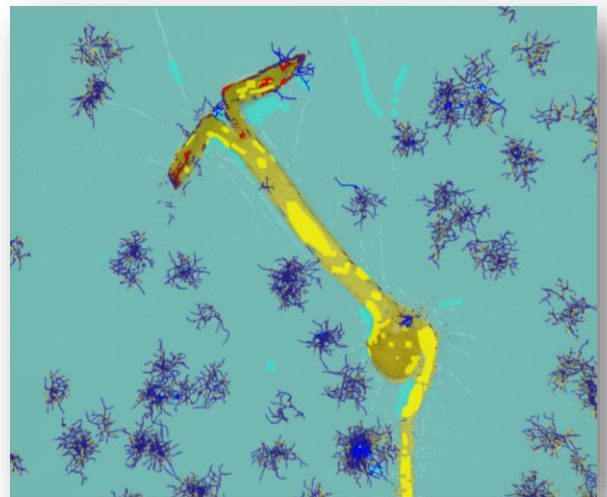
16/02/3003

Sous la Christophe Veronesi

**STAGE REALISE A L'INSTITUT DE RECHERCHE EN  
HORTICULTURE ET SEMENCES (IRHS – UMR 1345)**

**DU 14 AVRIL 2025 AU 18 JUILLET 2025**

Maître de stage : Philippe Grappin



## **Jury**

Président : Philippe Simier

Directeur : Christophe Veronesi

Membre : Thomas Guillemette

Membre : Philippe Grappin

Soutenu publiquement le 1/07/2025





## DUNE : Dépôt numérique des étudiants

### Autorisation de diffusion en ligne

#### Partie réservée à l'étudiant·e

Courriel : alexandrebignon86@gmail.com

N° étudiant·e : 24009039

Je soussigné·e **BIGNON Alexandre**

certifie être l'auteur·e du document intitulé

Développement d'un outil de phénotypage pour étudier la sensibilité d'*Arabidopsis thaliana* à *Alternaria brassicicola*

préparé sous la direction de **VERONESI Christophe**

et soutenu le **01/07/2025**

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

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

☒ accès tout public

À compter : ☒ de la date de soutenance

☐ accès réservé communauté universitaire

☐ du :

☐ **Je n'autorise pas la diffusion du document**

Le : 17/06/2025

A : Angers

Signature :



## Partie réservée au maître ou à la maîtresse de stage

Nom du (de la) maître de stage : GRAPPIN Philippe

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

☒ accès tout public

À compter : ☒ de la date de soutenance

☐ accès réservé communauté universitaire

☐ du :

☐ **Je n'autorise pas la diffusion du document**

Le : 17/06/2025

A : Angers

Signature :



## Partie réservée aux membres du jury

Nom(s) :

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

☐ sans corrections

☐ accès tout public

À compter : ☐ de la date de soutenance

☐ avec corrections

☐ accès réservé communauté  
universitaire

☐ du :

☐ **Je n'autorise pas la diffusion du document**

Le :

A :

Signature(s) :

## REMERCIEMENT

Je tiens tout d'abord à remercier Philippe Grappin pour m'avoir offert l'opportunité de réaliser ce stage au sein de l'Institut de Recherche en Horticulture et Semences (IRHS). Sa vision, ses conseils et son expertise ont grandement contribué à la réalisation de ce travail.

Je remercie également Sophie Aligon pour son investissement constant, malgré un emploi du temps chargé. Son encadrement attentif lors des nombreuses expériences ainsi que ses conseils sur l'organisation des manipulations ont été particulièrement précieux.

Je suis reconnaissant envers la plateforme d'imagerie cellulaire IMAC, et plus particulièrement Aurélia Rolland et Fabienne Simonneau, pour m'avoir permis d'accéder au microscope et au logiciel ZEN, outils indispensables au bon déroulement du stage. Leur expertise, leur disponibilité et leur bienveillance lors de ma formation, notamment pour répondre à mes nombreuses questions, ont vivement facilité l'acquisition et l'analyse des images.

Je remercie aussi chaleureusement l'ensemble de l'équipe FungiSem, en particulier Frank Bastide, Étienne Brémand, Justine Colou et Jérôme Bernardino, pour leur accueil, leur accompagnement, leurs conseils et leur bonne humeur, qui ont rendu ce stage aussi formateur qu'agréable.

Je souhaite également remercier mon camarade de stage, Éloi Copleutre, avec qui j'ai longuement échangé au sujet de la mise en page de ce rapport. Ces échanges nous ont permis, à tous deux, de mieux comprendre les consignes et de nous soutenir mutuellement dans cet exercice.

Enfin, je remercie ma famille et mes proches pour leur soutien constant tout au long de ce stage, aussi bien sur le plan moral que pratique. Leur présence bienveillante m'a permis d'aborder cette période avec sérénité, et leur aide précieuse lors de la relecture de ce mémoire a grandement contribué à sa finalisation.





## ENGAGEMENT DE NON PLAGIAT

Je, soussigné Alexandre Bignon

déclare être pleinement conscient que le plagiat de documents ou d'une partie d'un document publiée sur toutes formes de support, numérique ou papier, 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.

signé le 05 / 06 / 2025





## LISTE DES ABREVIATIONS

Ab43 : *Alternaria brassicicola* souche Ab43

AF : Auto Focus

BF : Basic Features

CRF : Conditional Random Field

DAI : Days After Inoculation

GF : Grossissement final

HR : Hypersensitive response

PDA : Potato Dextrose Agar

PSM : Poste de Sécurité Microbiologique

RT-PCR : Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction

UTR : Untranslated Region



# SOMMAIRE

Remerciement.....	7
Engagement de non plagiat.....	9
Liste des abréviations.....	11
Sommaire.....	13
Table des illustrations.....	15
Table des tableaux.....	17
1. Introduction.....	19
1.2. CONTEXTE .....	19
1.2.1. Enjeux de l'agriculture moderne.....	19
1.2.2. STRUCTURE D'ACCUEIL .....	19
1.2.3. Infrastructures .....	19
1.3. État des connaissances.....	21
1.3.1. Pathosystème <i>Arabidopsis thaliana</i> – <i>Alternaria brassicicola</i> .....	21
1.3.2. Projet STRESS PEPT et rôle des petits péptides.....	23
1.3.3. Outils de phénotypage.....	23
1.3.4. Objectif du stage .....	25
2. Matériel et méthode.....	29
2.2. Matériel.....	29
2.2.1. <i>Alternaria brassicicola</i> .....	29
2.2.2. <i>Arabidopsis thaliana</i> .....	29
2.2.3. Macroscopie .....	29
2.2.4. Logiciel ZEN .....	29
2.3. Méthodes.....	31
2.3.1. Préparation et inoculation du matériel infecté .....	31
2.3.1.1. Feuilles de rosettes .....	31
2.3.1.2. Plantules.....	31
2.3.2. Acquisition des images .....	33
2.3.2.1. Feuilles de rosettes .....	33
2.3.2.2. Plantules.....	33
2.3.3. L'analyse d'image .....	33
3. Résultats .....	37
3.2. Rosettes .....	37
3.2.1. Montage expérimental .....	37
3.2.2. Prise d'images .....	37
3.2.3. Analyse d'images.....	39
3.3. Plantules.....	41
3.3.1. Montage expérimental .....	41
3.3.2. Prise d'images .....	43
3.3.3. Analyse d'images.....	47

4. Discussion .....	51
5. Conclusion .....	57
Bibliographie .....	58
Abstract .....	60
Résumé .....	60

## TABLE DES ILLUSTRATIONS

Figure 1 : Photo d' <i>Alternaria Brassicicola</i> (souche Abra43), 15 jours après son repiquage. ....	20
Figure 2 : Voies de signalisation générale de la plante face aux champignons nécrotrophes et biotrophes. ....	22
Figure 3 : Macroscopie et accessoires utilisés pour l'acquisition des photos de plantules et de feuilles. ....	28
Figure 4 : Plantes d' <i>A.thaliana</i> sauvages et mutantes au stade rosette. ....	30
Figure 5 : Méthode d'inoculation des feuilles de rosettes. ....	30
Figure 6 : Méthode de séchage des graines après leur désinfection. ....	30
Figure 7 : Pourcentage de contamination des semences observé à 3 DAI pour les méthodes d'immersion et de gouttelette à différentes concentrations de suspension de conidies d' <i>A.brassicicola</i> ( $10^3$ , $10^4$ et $10^5$ conidies par mL). ....	32
Figure 8 : Photos de feuilles de rosettes d' <i>A.thaliana</i> permettant d'illustrer le processus d'entraînement du modèle de segmentation «trained model – nécroses sur feuille V2». ....	32
Figure 9 : Photos de plantules d' <i>A.thaliana</i> permettant d'illustrer le processus d'entraînement du modèle de segmentation «trained model – conidies + nécrose sur plantule». ....	34
Figure 10 : Plante d' <i>Arabidopsis</i> au stade feuille de rosette traitées par un inoculum. ....	34
Figure 11 : Échantillonnage des feuilles de rosette inoculées (6 DAI) sur boîte de Pétri pour la prise d'image. ....	36
Figure 12 : Comparaison des prises de vues des feuilles de rosette dans les différentes conditions de réglage du macroscopie. ....	36
Figure 13 : Segmentation d'une feuille de rosette en fonction de différents valeurs de BF. ....	38
Figure 14 : Segmentation d'une feuille de rosette ( <b>a</b> ) avec ou ( <b>b</b> ) sans post-traitement BRF. ....	38
Figure 15 : Segmentation d'une feuille de rosette réalisée ( <b>a</b> ) uniquement par le modèle de segmentation, ( <b>b</b> ) par le modèle de segmentation couplé au script d'analyse. ....	40
Figure 16 : Représentation graphique des surfaces de nécroses mesurées manuellement (en bleu) et par l'outil automatisé sur le logiciel ZEN (en rouge) ...	40
Figure 17 : Prises de vue de plantules à 6 DAI ayant poussées sur une boîte orientée à 180°. ....	42
Figure 18 : Prises de vue de plantules à 6 DAI ayant poussées sur une boîte orientée à 90°. ....	42
Figure 19 : Plan de semis test contenant des dispositions de graines différents. ....	44
Figure 20 : Prises de vues comparant différents profils d'agencements de plantules à 6 DAI. ....	44
Figure 21 : Plan de semis final, permettant d'analyser de 30 graines par boîte de Pétri carré ....	46
Figure 22 : Prises de vue de plantules à 10 DAI avec l'objectif 1x pour un GF ( <b>a</b> ) X16 et ( <b>b</b> ) X20. ....	46
Figure 23 : Prises de vues d'une plantule à 10 DAI ( <b>a</b> ) en un seul plan ou avec plusieurs plans focaux (30 images) fusionnés avec un traitement EDF par ( <b>b</b> ) contraste, ( <b>c</b> ) variance, ( <b>d</b> ) wavelet. ....	46
Figure 24 : Z-stacks d'une plantule à 10 DAI réalisés avec ( <b>a</b> ) 30 photos ; ( <b>b</b> ) 20 photos et ( <b>c</b> ) 13 photos ....	48
Figure 25 : Segmentation d'une plantule en fonction de différents valeurs de BF. ....	48
Figure 26 : Segmentation d'une plantule ( <b>a</b> ) avec ou ( <b>b</b> ) sans post-traitement CRF. ....	50

Figure 27 : Segmentation d'une plantule réalisée (**a**) uniquement par le modèle de segmentation, (**b**) par le modèle de segmentation couplé au script d'analyse.. 50



## TABLE DES TABLEAUX

Tableau 1 : Noms des lignées mutantes et des gènes sur lesquelles elles sont mutées, par insertion d'ADN-T. ....	28
--	----



# 1. INTRODUCTION

## 1.2. CONTEXTE

### 1.2.1. Enjeux de l'agriculture moderne

L'agriculture moderne a besoin de solutions pour s'adapter à des stress biotiques et abiotiques de plus en plus fréquents. Ces stress engendrent des pertes de production et de rendements considérables, créant ainsi des risques sanitaires (Wahab et al. 2025) et un manque à gagner important pour les agriculteurs, alors même que l'augmentation de la population mondiale nécessiterait d'augmenter leur production de plus de 50 % d'ici à 2050 (National Academies of Sciences, Engineering, and Medicine, 2019). Ainsi, pour répondre à ces enjeux, les agriculteurs ont recours à des fertilisants et des produits phytosanitaires, dont les effets sont délétères pour la santé et l'environnement, polluant l'eau, les sols et l'air (Muller et al. 2017 ; Yadav et al. 2023).

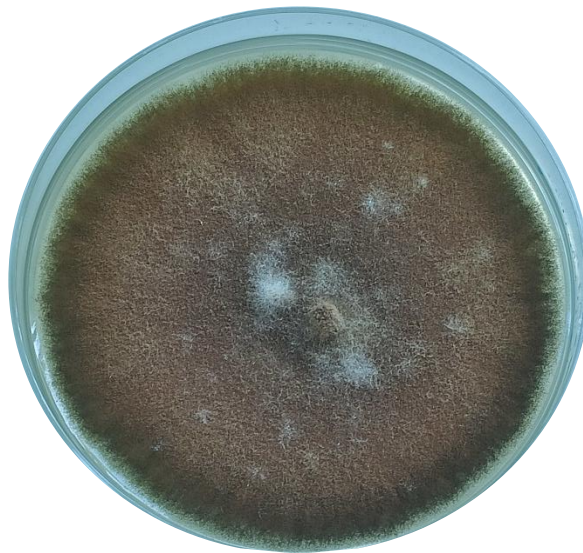
### 1.2.2. STRUCTURE D'ACCUEIL

Œuvrer au développement de systèmes de productions performants, sains et durables est donc un enjeu de taille auquel l'Institut de Recherche en Horticulture et Semence (IRHS) essaie de répondre. Cette unité mixte de recherche (UMR 1345) qui m'a accueilli pour ce stage a été créée en 2012 sous les tutelles de l'INRAE, l'Institut Agro Rennes-Angers et de l'Université d'Angers. L'unité est constituée de 14 équipes travaillant sur différents modèles tel que : les rosiers, les espèces ornementales, les espèces fruitières à pépins, les carottes, les semences, les bactéries et les champignons phytopathogènes, afin d'enrichir les connaissances sur la qualité et la santé des espèces horticoles et la production de semences. Ces équipes recouvrent des expertises en génomique, phytopathologie, bio-informatique ou encore microbiologique et travaillent en collaboration sur 4 axes d'études : Mécanismes de réponse et d'adaptation des plantes à l'environnement biotique et abiotique ; Mécanismes et stratégies de bio contrôle et autres méthodes alternatives aux intrants chimiques ; Histoires évolutives des plantes et microorganismes associés ; Recherche méthodologique et développement d'outils innovants. Au sein de ces équipes, l'IRHS rassemble plus de 250 agents, parmi lesquels figurent, entre autres, des enseignants-chercheurs, des doctorants et post-doctorants, des ATER, des ingénieurs et des techniciens. Ces agents sont spécialisés dans divers domaines et collaborent afin de faire avancer la recherche en créant des discussions enrichissantes et des idées innovantes (IRHS, a ; IRHS, b).

### 1.2.3. Infrastructures

J'ai été accueilli au sein de l'équipe FungiSem dont l'objectif est d'élucider les mécanismes responsables du pouvoir pathogène des champignons des semences, notamment ceux appartenant au genre *Alternaria* et qui sont pour le moment encore mal connus. L'équipe FungiSem étudie les facteurs de pathogénicité et de résistance du champignon, ainsi que les mécanismes de défense de la graine et le rôle de son microbiote. L'objectif est d'améliorer la résistance des plantes aux maladies en développant des solutions de biocontrôle et de biostimulation des semences, alternatives à l'usage de produits phytosanitaires (Bataillé-Simoneau, 2024).

Au cours de ce stage, j'ai également eu la chance de collaborer avec la plateforme d'imagerie cellulaire IMAC, qui est un plateau technique appartenant à la Structure Fédérative de Recherche en Qualité et Santé du Végétal (SFR Quasav). Cette plateforme propose un accès à des technologies et des équipements d'imagerie



*Figure 1 : Photo d'Alternaria Brassicicola (souche Abra43), 15 jours après son repiquage. Ce dernier a été repiqué par explant de gélose sur milieu PDA.*

et de microscopie de pointe ainsi qu'à une expertise à travers le personnel présent sur le plateau. IMAC est donc une référence en matière d'étude histologique et cytologique au sein de l'IRHS (Rolland, 2025).

### 1.3. ÉTAT DES CONNAISSANCES

#### 1.3.1. Pathosystème *Arabidopsis thaliana* – *Alternaria brassicicola*

Parmi les champignons étudiés par l'équipe FungiSem, on retrouve notamment *Alternaria brassicicola* (*A. brassicicola*) (Figure 1). Ce champignon phytopathogène appartient au groupe des Dothideomycetes et infecte une large gamme d'hôtes au sein de la famille des Brassicacées sur lesquels il provoque des taches noires. Le champignon est transmissible aux semences et par les semences et il peut survivre plusieurs années dans les résidus de cultures, ce qui en fait un pathogène particulièrement compliqué à gérer dans les systèmes biologiques de production de semences et de légumes. La maladie des taches noires qu'il provoque est d'importance mondiale, pouvant provoquer des pertes de rendement agricole allant de 20 à 50% dans les cultures de colza. Contrairement aux champignons biotrophes qui se nourrissent de tissus vivants uniquement, *A. brassicicola* est un champignon nécrotrophe qui détruit les tissus des parties aériennes de ses hôtes avant de pouvoir dégrader puis absorber les nutriments nécessaires à son développement (Cho, 2015 ; Köhl et al., 2009). Il provoque ainsi généralement des nécroses, souvent entourées de zones chlorotiques (Belmas et al., 2018). *A. brassicicola* a donc besoin de facteurs de pathogénicité pour pouvoir détruire les cellules végétales desquelles il se nourrit. La plupart des facteurs retrouvés chez les champignons nécrotrophes sont des toxines spécifiques, des enzymes de dégradation de la paroi cellulaire (cellulases, pectinases...) ou encore des lipases. Néanmoins, malgré l'identification de nombreux gènes potentiellement impliqués dans la pathogénicité d'*A. brassicicola*, aucun n'a été clairement établi comme facteur de virulence majeur. Ainsi, la nature exacte des éléments responsables du pouvoir pathogène d'*A. brassicicola* reste à élucider (Cho, 2015).

Ainsi, étant donné le manque d'information à son sujet et la menace qu'il représente, ce champignon est particulièrement étudié par l'équipe FungiSem, notamment à travers l'hôte *Arabidopsis thaliana* (*A. thaliana*). Cette plante est particulièrement intéressante pour étudier *A. brassicicola* car il s'agit d'une plante modèle, en raison de son petit génome, de son importante densité de gènes et de son cycle de vie court. Elle est également largement documentée dans la littérature scientifique et son génome est le premier à avoir été entièrement séquencé (Filipski and Kumar, 2005). Qui plus est, *A. thaliana* appartient à la famille des Brassicacées, spécifiquement sensible à ce champignon. Pochon et al. (2012) souligne par ailleurs qu'*A. thaliana* est un hôte modèle pour l'étude des interactions plantes-pathogènes pendant la phase végétative, particulièrement le pathosystème *A. thaliana* – *A. brassicicola*, propice à l'étude de la transmission du pathogène aux semences. La transmission du champignon au niveau des siliques a été décrite, notamment via les jonctions cellulaires, le replum, les stomates, ainsi que dans les téguments des graines. Cette capacité s'explique par le fait que le champignon peut pénétrer ces structures soit directement, soit en empruntant des fissures (Pochon et al., 2012).

D'autres travaux menés par Ortega-Cuadros et al. (2022 ; 2024) documentent des réponses immunitaires de la graine en germination et des jeunes plantules différentes des mécanismes identifiés sur le modèle plante au stade feuille de rosette. En effet, lorsque des feuilles de rosettes d'*A. thaliana* sont inoculées avec *A. brassicicola*, elles induisent les voies du jasmonate et de l'éthylène caractéristiques des mécanismes de défenses généralement décrits contre un pathogène nécrotrophe (Figure 2). Lorsqu'une graine en germination est inoculée par le champignon, des approches transcriptomiques mettent en évidence une induction de la voie de l'acide

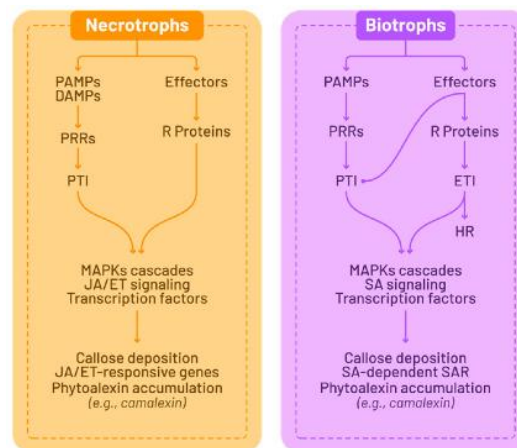


Figure 2 : Voies de signalisation générale de la plante face aux champignons nécrotrophes et biotrophes.

La réponse immunitaire des plantes matures contre les champignons phytopathogènes diffère en fonction de leur mode trophique. Les champignons nécrotrophes déclenchent généralement les voies de signalisation du jasmonate et de l'éthylène tandis que les champignons biotrophes induisent la voie de l'acide salicylique. Ces réponses rapides sont initiées par les Récepteurs de Reconnaissance des agents Pathogènes (PRR), puis évoluent de l'Immunité déclenchée par P/MAMP (PTI) à l'Immunité déclenchée par les Effecteurs (ETI) lors de l'évasion par les agents pathogènes. Adapté de Ortega-Cuadros et al., (2024).

salicylique et, en plus faible mesure, celle de l'éthylène au cours de la germination et de la levée, au détriment de la voie du jasmonate. Néanmoins, ces voies favorisent, entre autres, l'apparition de nécroses par des mécanismes de réponses hypersensibles (HR) permettant de stopper la propagation des agents pathogènes biotrophes (Figure 2) (Ortega-Cuadros et al., 2024). Ce type de réponse pourrait ainsi constituer un détournement vers des voies de défense inappropriées de la plante par le champignon pour induire une réponse de susceptibilité privilégiant son développement (Ortega-Cuadros et al., 2022 ; Ortega-Cuadros et al., 2024).

Il apparaît donc essentiel de distinguer les réponses de la plante selon son stade de développement, en particulier entre la graine en germination ou au stade post-levée précoce et la plante au stade rosette, afin de mieux caractériser les stratégies mises en œuvre face à l'agent nécrotrophe. Par ailleurs, l'implication potentielle de petits peptides dans la réponse d'*A. thaliana* à *A. brassicicola*, suggérée par des approches transcriptomiques (Ortega et al. 2022 ; 2024), renforce la pertinence d'une analyse par génétique fonctionnelle. Cette perspective justifie le développement d'un outil dédié à la quantification des symptômes, permettant d'évaluer la sensibilité d'*A. thaliana* aussi bien au stade rosette qu'au stade post-germinatif ou jeune plantule.

### **1.3.2. Projet STRESS PEPT et rôle des petits peptides**

Au sein de l'IRHS, une diversité de mécanismes de résistance des plantes aux stress biotiques sont étudiés, incluant notamment l'implication de petits peptides appelés SPP (Small Signaling Peptides) codés par le génome de la plante (Aubourg, 2021). Les SPP ont une structure simple, généralement dépourvue de structure tridimensionnelle, composée de moins de 100 acides aminés. Ces molécules bioactives ont un rôle de signalisation crucial dans la communication locale de cellule-à-cellule ou à plus longue distance et sont parfois appelées hormones peptidiques ou peptides hormones. Les SPP régulent de nombreux processus impliqués dans la croissance et le développement des plantes et sont essentiels pour la médiation des réponses aux stress environnementaux, qu'ils soient biotiques ou abiotiques. Ces peptides permettent aussi aux plantes de se défendre contre les agents pathogènes et les ravageurs (Aubourg, 2021 ; Chang and Xiao, 2025 ; Ji et al., 2025 ; Keerthana et al., 2025 ; Shi, 2020 ; Takahashi et al., 2019).

Néanmoins, bien que l'identification du premier petit peptide chez les plantes date de 1991, les petits gènes codants ont longtemps été négligés lors d'analyses génomiques. Leur étude approfondie est donc récente et elle est due aux avancées technologiques en biologie moléculaire, en biochimie et en bio-informatique (Chang and Xiao, 2025 ; Ji et al., 2025 ; Keerthana et al., 2025 ; Shi, 2020 ; Takahashi et al., 2019). L'identification de familles de peptides et l'étude de leur rôle dans la résistance aux agents pathogènes est abordée à l'IRHS dans le cadre du projet ANR STRESS PEPT coordonné par Sébastien Aubourg. Ce projet débuté en 2021 a déjà permis d'identifier des SPP dont l'expression varie chez *A. thaliana* lorsque la plante est infectée par le champignon *A. brassicicola*. L'approche fonctionnelle de ces peptides prévoit de caractériser des mutants affectés dans l'activité des gènes codant ces peptides pour leur sensibilité aux agents pathogènes. L'objectif maintenant est donc de développer un outil de phénotypage des symptômes d'infection chez ces mutants (Aubourg, 2021 ; Aubourg, communication personnelle).

### **1.3.3. Outils de phénotypage**

Le phénotypage est défini comme l'étude systématique du phénotype, c'est-à-dire de l'ensemble des caractéristiques observables chez un organisme, telles que sa morphologie, son comportement et ses propriétés physiologiques. Il y a une décennie encore, le phénotypage était considéré comme en retard par rapport aux progrès importants réalisés en génotypage (Lin, 2015 ; Mutka and Bart, 2015). Certains scientifiques qualifient même le phénotypage de « goulot d'étranglement » limitant





l'amélioration génétique et le suivi précis des cultures (Chawade et al. 2019 ; Gill et al., 2022). Traditionnellement, l'évaluation des symptômes de maladies, comme les nécroses, repose sur une inspection visuelle manuelle (Mutka and Bart, 2015 ; Pieruschka and Schurr, 2019 ; Tanner et al., 2022) dictée par un protocole adapté à l'expérimentation. Cette méthode est encore largement utilisée en recherche fondamentale, car elle est simple à mettre en œuvre, nécessite peu d'équipement et est peu coûteuse. En revanche, elle présente des désavantages comme le fait qu'elle soit peu précise, donc difficilement reproductible, laborieuse et chronophage (Gill et al., 2022 ; Mutka and Bart, 2015 ; Tanner et al., 2022). Elle est également limitée à ce qui est visible à l'œil humain et nécessite du personnel entraîné (Tanner et al., 2022). Par conséquent, le développement de techniques de phénotypage haute performance, ou phénotypage de précision, est considéré comme l'option indispensable pour faire progresser le domaine de la phénologie (Lin, 2015). Ces 10 dernières années, grâce aux progrès réalisés en informatique, le phénotypage a obtenu de plus en plus d'attention. L'intégration de nouvelles technologies comme la robotique, la vision par ordinateur, la télédétection et l'intelligence artificielle a conduit au développement de systèmes de phénotypage plus performants basés sur l'imagerie (Dhondt et al., 2013 ; Lin, 2015 ; Pavicic et al., 2021 ; Pieruschka and Schurr, 2019 ; Tanner et al., 2022). Ces améliorations permettent des mesures répétées dans le temps, un débit plus élevé et une quantification plus objective (Mutka and Bart, 2015 ; Tanner et al., 2022) car basée sur le mécanisme de segmentation. La segmentation correspond à l'attribution de chaque pixel de l'image à une classe, ce qui permet de diviser l'image en objets, c'est-à-dire en groupes de pixels côte à côte appartenant à la même classe (ZEISS, a). Il devient dès lors possible d'obtenir et donc d'analyser des informations quantitatives concernant ces objets (aire, périmètre, circularité, nombre, etc.) à partir d'images complexes. Néanmoins, la plupart des méthodes qui en résultent doivent être adaptées au modèle biologique à considérer, sont particulièrement lourdes à créer et à mettre en place et nécessitent des connaissances développées en programmation et en informatique (Pavicic et al., 2021 ; Barrit et al., 2022). Elles constituent par ailleurs, pour la plupart, des services payants proposés par des plateformes spécialisées dans le phénotypage. Ces outils sont donc peu adaptés au phénotypage rapide, à l'échelle locale d'une équipe, pour l'analyse de quelques mutants.

Des outils de segmentation permettant l'analyse de symptômes nécrotiques sur *A. thaliana* ont déjà été développés. Par exemple, Barrit et al. (2022) a mis au point un outil capable de mesurer les surfaces nécrotiques induites par *A. brassicicola* sur des plantules. De son côté, Pavicic et al. (2021) a développé un outil semi-automatique pour analyser les nécroses et chloroses causées par *Botrytis cinerea* sur des feuilles de rosette. Toutefois, à ce jour, aucun outil ne permet une évaluation conjointe des surfaces de conidies et de nécroses sur plantules, ainsi que des surfaces nécrotiques sur feuilles de rosette. Par ailleurs, ces deux outils nécessitent des compétences développées en programmation. En effet, ils ont, dans les deux cas, nécessité l'écriture de scripts sur les logiciels Ilastik ou FIJI, et l'outil développé par Pavicic et al. fonctionne même grâce à des tapis roulants et des capteurs de positions.

### 1.3.4. Objectif du stage

L'objectif de ce stage est donc de développer un outil de phénotypage facile d'accès qui permette de caractériser la sensibilité de mutants d'*Arabidopsis thaliana* dans un contexte d'infection par *Alternaria brassicicola*. À l'issue de la création de cet outil, 4 mutants affectés dans l'activité de gènes codant des peptides identifiés dans le cadre du projet STRESS PEPT seront caractérisés pour leur sensibilité au champignon et permettront de valider le caractère opérationnel de l'outil de phénotypage. Étant à visée locale, l'outil doit être adapté au maximum aux exigences du projet. Ainsi, le développement sera mis au point chez *A. thaliana* sur deux modèles d'étude : la feuille de rosette et la plantule à stade post-germinatif.



(10 jours après semis). Le but de l'outil est de mesurer des surfaces de nécroses sur feuille de rosette et plantule ainsi que des surfaces de conidies sur plantule, afin de fournir des résultats sous forme de variables quantitatives. Par ailleurs, le dispositif se doit aussi d'être semi-automatique, accessible par tous et à débit moyen afin de faciliter sa manipulation par du personnel non entraîné, tout en permettant le traitement d'un grand nombre d'images dans un délai de temps raisonnable.

Trois phases de développement sont prévues pour chacun des deux modèles d'étude : (1) la préparation des échantillons biologiques, pour faciliter l'acquisition des images ; (2) la mise en place de conditions standardisées de prises d'image qui permettent de quantifier les symptômes par analyse d'image et (3) l'analyse d'image à proprement parler avec le développement d'un script d'analyse et d'un modèle de segmentation par classification de pixels, basé sur du machine learning (apprentissage automatique).

Une fois le développement de l'outil achevé, il sera utilisé par l'équipe FungiSem dans un premier temps pour caractériser les mutants de peptides identifiés dans le cadre du projet STRESSPEPT. L'outil sera réutilisable par d'autres équipes de l'IRHS dans le cadre de leurs projets, moyennant la mise en place d'un protocole de prise d'image, d'un script d'analyse et d'un modèle de segmentation intelligent adapté à leurs conditions expérimentales.

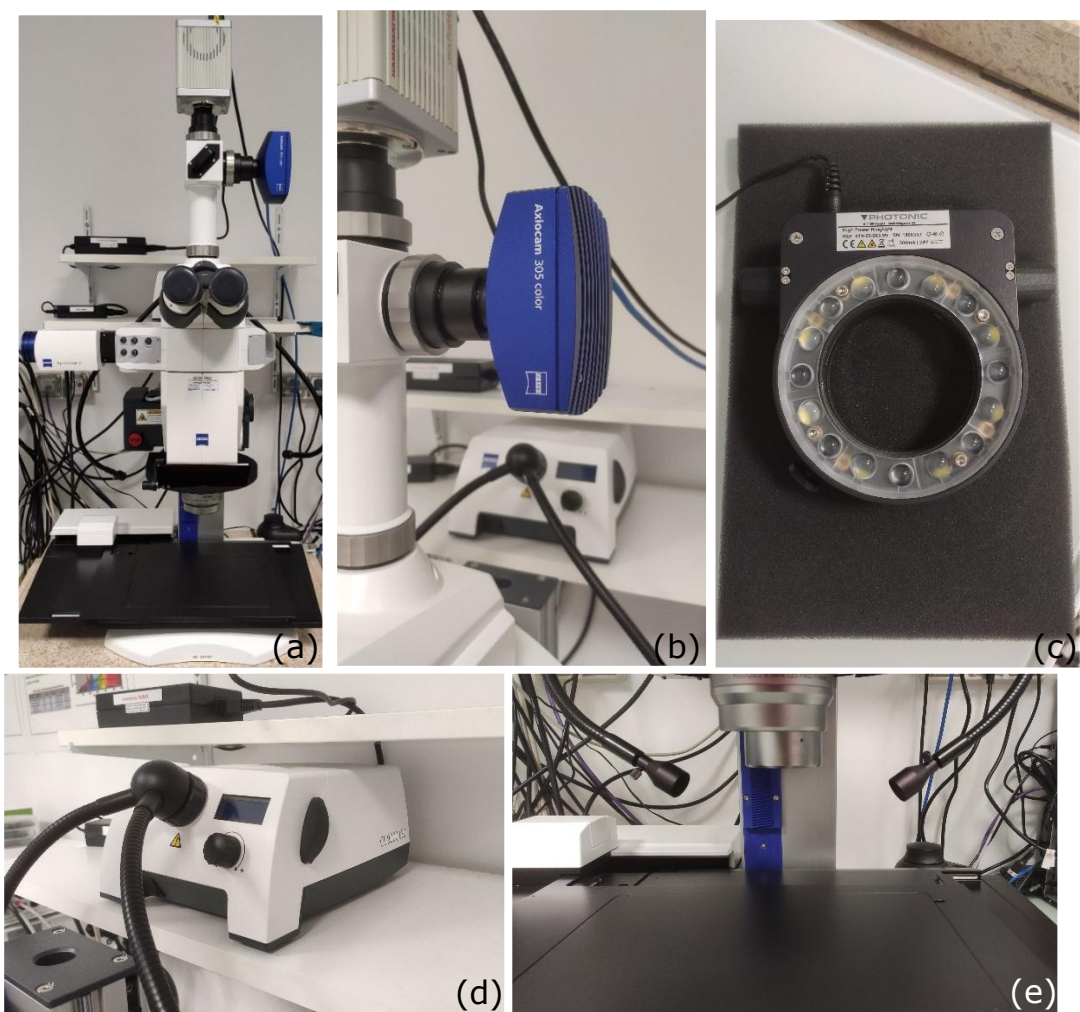


Figure 3 : Macroscope et accessoires utilisés pour l’acquisition des photos de plantules et de feuilles.  
(a) photo du macroscope AXIO Zoom V.16 de ZEISS. (b) caméra couleur Axiocam 305 color de ZEISS. (c) lampe annulaire LED High-Power Ring Light. (d) source lumineuse CL 9000 LED utilisée pour l’éclairage par col de cygne. (e) éclairage par col de cygne

Tableau 1 : Noms des lignées mutantes et des gènes sur lesquelles elles sont mutées, par insertion d’ADN-T.  
Les noms utilisés dans ce rapport sont ceux du projet STRESS PEPT. Adapté de Rouvier (2024)

Nom lignée (STRESS PEPT)	Nom de lignée officiel	ID dans base de données NASC	Gène cible
lignée 6'	SAIL_628_B05	N826941	At3g59930
lignée 25	SALK_037730C	N674514	AT2G43510
lignée 33	SALK_132861C	N681748	At2g25510
lignée 34	SALK_126639C	N682892	At1g29290

## 2. MATERIEL ET METHODE

### 2.2. MATERIEL

#### 2.2.1. *Alternaria brassicicola*

Le champignon utilisé pour inoculer les génotypes d'*A. thaliana*, est *Alternaria brassicicola* et plus précisément la souche Abra43, souche précédemment utilisée dans le cadre du projet STRESS PEPT pour identifier les SPP induits. Abra43 a été multipliée sur milieu gélosé PDA (Potato Dextrose Agar) Biokar Diagnostics, à une concentration de 39 g/L, en réalisant des explants de gélose en conditions stériles. Le champignon a ensuite été stocké en double contenant dans une mycothèque en obscurité presque totale afin de garantir son bon développement. Après 7 à 10 jours de culture, durée permettant la meilleure vigueur du champignon, ce dernier a ensuite été utilisé pour réaliser des solutions d'inoculation dont la méthodologie est décrite section 2.3.1.

#### 2.2.2. *Arabidopsis thaliana*

Le génotype d'*A. thaliana* sauvage nommée WT, et des lignées mutantes SAIL\_628\_B05, SALK\_037730C, SALK\_132861C, SALK\_126639C (génération T3 homozygotes, NASC) utilisées, sont issues de l'écotype Columbia-0 (Col-0). Ces lignées mutantes ont été sélectionnées dans le cadre du projet STRESS PEPTS, et sont affectées par une insertion T-DNA respectivement dans la séquence codante ou dans la région 5' UTR (Untranslated Region) des gènes At3g59930, AT2G43510, At2g25510, At1g29290. Ces gènes codent chacun un SPP qui a précédemment été décrit comme induit au niveau ARN dans les feuilles de rosettes inoculées par *A. brassicicola* (Tableau 1, projet STRESSPEPT). L'activité de ces gènes chez ces mutants a été analysée par RT-PCR (Rouvier, 2024).

#### 2.2.3. Macroscopie

Le macroscopie utilisé sur le plateau IMAC pour les prises d'images de feuilles et de plantules est le microscope stéréo AXIO Zoom.V16 (Figure 3). Développé par ZEISS, ce macroscopie présente l'avantage d'être entièrement motorisé sur les axes X, Y, au niveau du focus (axe Z) et au niveau de son zoom X16. Deux objectifs ont été utilisés : PlanNeoFluar Z 1.0x/0.25 FWD 56mm, avec un grossissement final (GF) allant du X7 au X112 ; PlanApo Z 0.5x/0.125 FWD 114mm, avec un GF allant du X3,5 à X56 et présentant un diamètre de champs plus grand permettant d'observer des échantillons plus gros. Sur ce macroscopie, deux sources lumineuses permettent un éclairage par réflexion : lampe annulaire réglable « LED High-Power Ring Light », Photonic ; lampe col de cygne « CL 9000 LED », ZEISS. Une source lumineuse au niveau de la base permet également un éclairage par transmission. Le macroscopie est relié à une caméra couleur « AxioCam 305 color » afin de réaliser les acquisitions. Ce macroscopie présente l'avantage d'être entièrement pilotable par le logiciel informatique ZEN.

#### 2.2.4. Logiciel ZEN

Le logiciel ZEN (ZEISS Efficient Navigation), développé par ZEISS et utilisé ici dans sa version 3.5, a servi à l'ensemble des étapes d'acquisition, de traitement et d'analyse des images par segmentation. Le logiciel permet notamment d'automatiser la prise d'image sur le macroscopie tout en lui ajoutant des fonctionnalités intéressantes comme l'autofocus (focus réalisé automatiquement) ou le Z-stack



Figure 4 : Plantes d'*A.thaliana* sauvages et mutantes au stade rosette. Ces dernières se sont développées durant 5 semaines en chambre de culture (22°C jour, 19°C nuit, 8h de lumière).

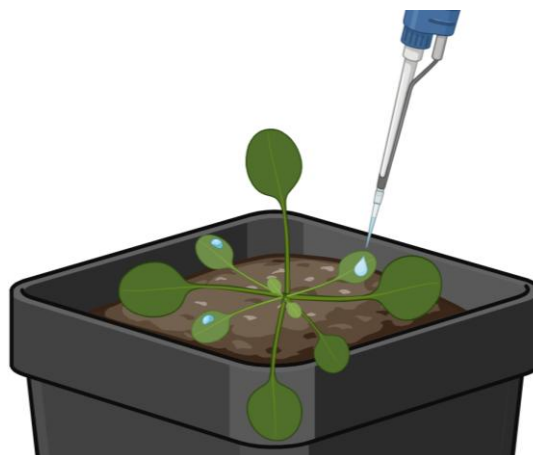


Figure 5 : Méthode d'inoculation des feuilles de rosettes. Un dépôt de 5µl d'eau Milli-Q ou de solution d'Abra43 à 105 conidies/ml est réalisé du même côté de la nervure pour 3 feuilles par plante.



Figure 6 : Méthode de séchage des graines après leur désinfection. Ces graines seront ensuite semées puis inoculées afin d'observer les contamination des plantules.



(série d'images acquises à différentes profondeurs le long de l'axe Z). ZEN intègre aussi le module « ZEN intellesis » qui permet la segmentation d'images grâce au processus de machine learning. Son utilisation ne requiert pas compétence en programmation.

## 2.3. METHODES

### 2.3.1. Préparation et inoculation du matériel infecté

#### 2.3.1.1. Feuilles de rosettes

Les semis sont réalisés en terreau (Traysubstrat, Klasmann ; 10 godets par lignée) avec un traitement biologique à l'aide de nématodes entomopathogènes de l'espèce *Steinernema feltiae*, qui parasitent spécifiquement les larves de sciarides (« Nématode Sf – 5 Millions », Biotop). Les larves de sciarides, en s'attaquant aux racines des jeunes plants, peuvent provoquer des dégâts importants et faciliter l'entrée de pathogènes. Puis les godets ont été placés dans des miniserres dans un réfrigérateur à l'obscurité à 5°C durant 48 h minimum afin de lever la dormance des graines. Les miniserres sont par la suite placées dans une chambre de culture en condition : 22°C jour, 19°C nuit, 8 h de lumière. Au bout d'une semaine, un éclaircissage est réalisé dans le but de garder une seule plante par pot et les couvercles des miniserres sont retirés. Les godets sont ensuite laissés en chambre de culture durant 4 à 5 semaines supplémentaires jusqu'à ce qu'elles atteignent le stade rosette (Figure 4).

Une fois les plantes arrivées au stade rosette, les feuilles sont inoculées. Pour cela, une solution d'Abra43 doit être réalisée. Les conidies sont récupérées par dépôt puis grattage d'1 ml d'eau Milli-Q (eau stérile dé-ionisée) sur une boîte d'Abra43 ayant été repiquée entre 7 et 10 jours auparavant, afin de garantir la vigueur du champignon. La solution ainsi créée est titrée à l'aide d'une cellule de Thoma puis une dilution est réalisée pour obtenir une solution finale de  $10^5$  conidies/ml pour l'inoculation des feuilles de rosette ou de  $10^4$  conidies/ml pour l'inoculation des graines en cours de germination. Dans le cas de l'inoculation des feuilles de rosettes, pour chaque lignée, 1 plante témoin, numérotée 1, sera inoculée avec de l'eau Milli-Q et les 9 autres plantes, numérotées 2 à 10, avec une solution à  $10^5$  conidies/ml d'Abra43. Pour chacune de ces plantes, 3 feuilles seront sélectionnées en veillant à ce que ces dernières ne soient ni les plus vieilles, ni les plus jeunes, ne dépassent pas du godet et que leur limbe ne soit pas collé au substrat afin de limiter au maximum la variabilité. Chacune des 3 feuilles recevra ensuite une goutte de 5 µl (d'eau Milli-Q ou de solution d'inoculation) du même côté de la nervure centrale que toutes les autres plantes (Figure 5).

Une fois les 150 feuilles inoculées, les godets sont placés dans des miniserres saturées en eau, dans une chambre de culture en condition : 22°C jour, 19°C nuit, 8 h de lumière durant 6 jours. Les 2 premiers jours, les serres sont emballées dans des bâches occultante afin de garder les plantes à l'obscurité pour favoriser la pénétration d'Abra43.

#### 2.3.1.2. Plantules

Avant d'être inoculées, les graines utilisées pour l'analyse des plantules sont désinfectées sous Poste de Sécurité Microbiologique (PSM). Pour cela, 12 mg de graines par échantillon sont plongés et agités dans 1 mL d'éthanol à 70 % pendant 2 minutes, puis dans 1 mL d'eau de Javel à 30 % durant 7 minutes. Les graines sont ensuite rincées 5 fois avec de l'eau Milli-Q puis sont mises à sécher une nuit par dépôts de petits tas dans une boîte de pétri ouverte sous PSM (Figure 6) (Rouvier, 2024).

Les graines ont ensuite été semées une à une, à l'aide de cure-dents autoclavés, sur des gels d'agaroses à 0,8% dans des boîtes de Pétri carrées au format

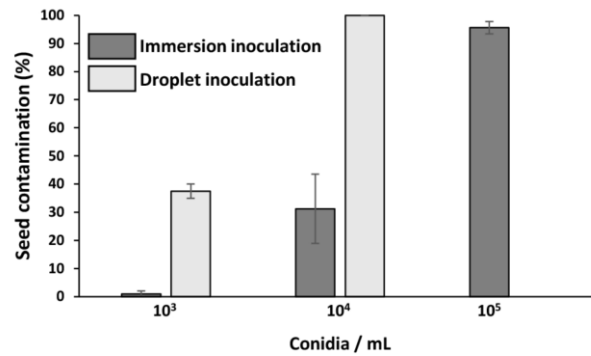


Figure 7 : Pourcentage de contamination des semences observé à 3 DAI pour les méthodes d'immersion et de droplet à différentes concentrations de suspension de conidies d'*A.brassicicola* ( $10^3$ ,  $10^4$  et  $10^5$  conidies par mL).

Les valeurs correspondent à la moyenne de 20 semences par réplica biologique, 8 réplicas biologiques. Les barres d'erreur indiquent l'erreur standard de la moyenne. Adapté de Barrit et al. (2022).

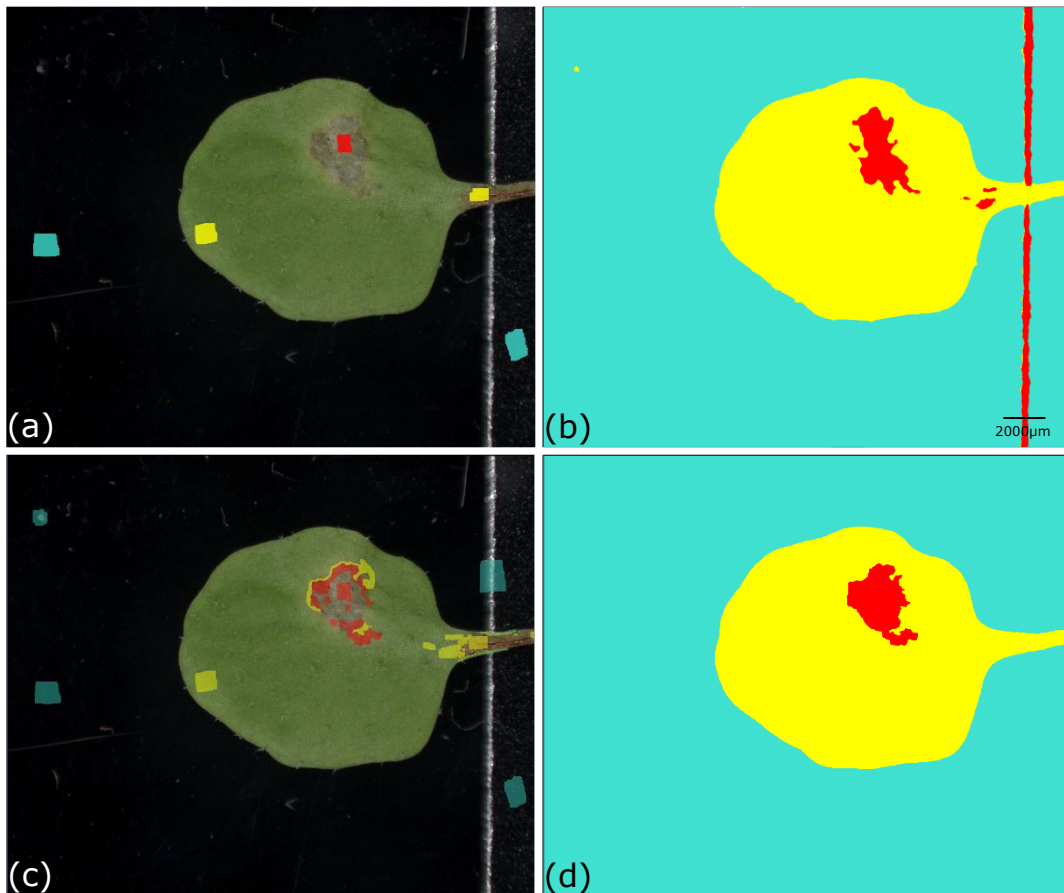


Figure 8 : Photos de feuilles de rosettes d'*A.thaliana* permettant d'illustrer le processus d'entraînement du modèle de segmentation «trained model – nécroses sur feuille V2». Les feuilles ont été photographiées à 6 DAI avec un objectif 0,5x au GF X4. (a) 1ère annotation manuelle. (b) 1ère segmentation issue de la 1ère annotation. (c) dernière annotation manuelle. (d) dernière segmentation issue des annotation réalisées. Légende de segmentation : cyan = arrière-plan, jaune = feuille non nécrosée, rouge = nécrose



120x120x13mm. Dans le cadre du développement de l'outil de phénotypage des plantules, différents plans de semis ont été testés afin de déterminer lequel serait le plus intéressant pour l'acquisition des images. Les différents tests sont détaillés dans la partie 3.3.1. Après avoir été semées, les graines ont été inoculées par la méthode « droplet », mise au point par Barrit et al. (2022). Cette méthode consiste à déposer une goutte de 1 µl de solutions d'Abra43 à 10<sup>4</sup> conidies/ml sur chacune des graines. D'après les résultats obtenus par Barrit et al. (2022), cette méthode semble contaminer de manière plus homogène les graines que l'inoculation par immersion traditionnellement utilisée (Figure 7).

Une fois les graines inoculées, les boîtes de Petri ont été filmées et placées en chambres de culture en condition : 20°C, 16 h de lumière durant 10 jours afin de laisser les graines germer et les symptômes apparaître. Au cours de cette étape, certaines boîtes ont été inclinées à différents degrés en s'inspirant des travaux réalisés par Barrit et al. (2022), pour étudier si l'inclinaison de la boîte pouvait faciliter la prise de vue des plantules en les collant à la gélose. Ces différents paramètres font partie de la mise en place du montage expérimental destiné à la prise de vue des plantules et sont détaillés, comme le plan de semi, dans la partie 3.3.1.

## **2.3.2. Acquisition des images**

### **2.3.2.1. Feuilles de rosettes**

L'acquisition des feuilles de rosettes est réalisée à 6 DAI (days after inoculation), à l'aide du microscope et du logiciel ZEN, selon un montage expérimental qui a fait l'objet d'une mise au point expérimentale (détaillée dans la partie 3.2.2). L'onglet Acquisition du logiciel permet le contrôle presque complet du microscope via un ordinateur, que ce soit les coordonnées spéciales (axes X et Y), la mise au point (axe Z), ou même encore le niveau de zoom utilisé. Les détails des paramètres sélectionnés pour la prise d'image des feuilles sont présentés dans la partie 3.2.2.

### **2.3.2.2. Plantules**

L'acquisition d'images sur plantules est réalisée au stade 10 DAI (days after inoculation). Ces dernières ont été directement photographiées sur la gélose, sans nécessiter de montage expérimental spécifique. Les photos sont réalisées à l'aide du microscope et du logiciel ZEN, via l'onglet Acquisition qui permet une prise d'image semi-automatisée. Celle-ci repose sur l'enregistrement de coordonnées (menu « tiles »), un autofocus logiciel (menu « Software Autofocus » et « focus strategy ») et la capture de photos en Z-stacks pour obtenir plusieurs plans de netteté (menu « Z-stack »). Les images réalisées en Z-stack sont ensuite traitées dans l'onglet Processus à l'aide de la méthode Extended Depth Focus (EDF), permettant de générer une image finale combinant les zones nettes de chaque plan. Les détails des paramètres sélectionnés pour la prise d'image des plantules sont présentés dans la partie 3.3.2.

## **2.3.3. L'analyse d'image**

L'analyse des images de feuilles et de plantules a nécessité le développement de deux modèles de segmentation intelligents par classification de pixels. Ces modèles respectivement appelés « trained model – nécroses sur feuille V2 » pour les feuilles et « trained model – conidies + nécroses sur plantule » pour les plantules ont été développés via l'onglet « Analysis » de ZEN grâce au module de machine learning « ZEN intellesis ». Leur objectif est d'attribuer chaque pixel de l'image, à une classe en étant le plus juste possible. Le modèle développé pour analyser les photos de

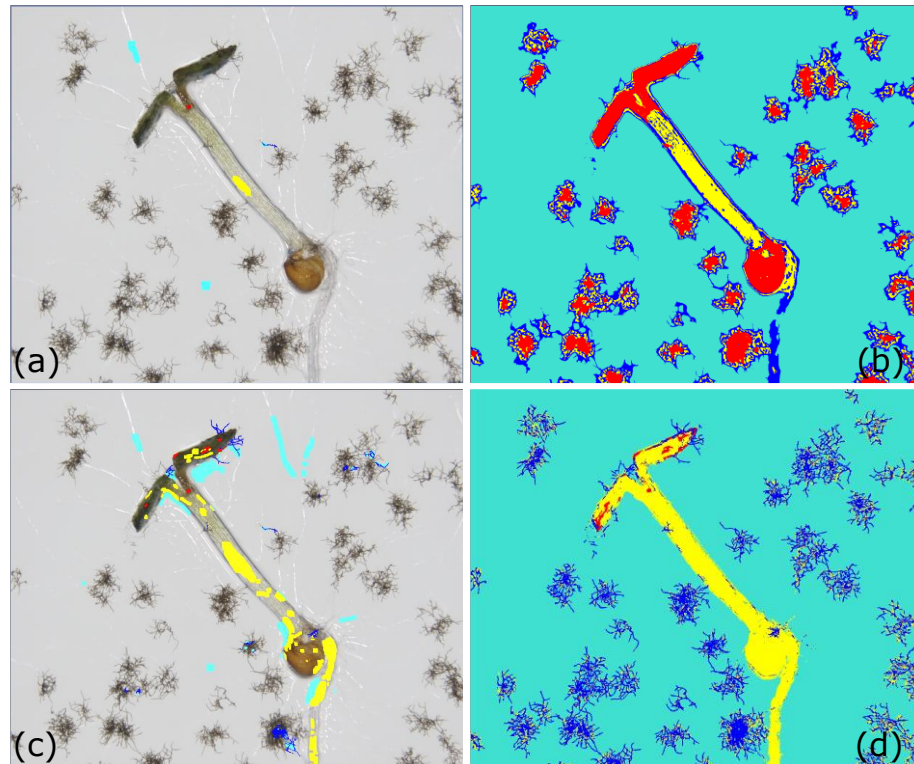


Figure 9 : Photos de plantules d'*A.thaliana* permettant d'illustrer le processus d'entraînement du modèle de segmentation «trained model – conidies + nécrose sur plantule». Les plantules ont été photographiées à 10 DAI avec un objectif 1x au GF X16. (a) 1ère annotation manuelle. (b) 1ère segmentation issue de la 1ère annotation. (c) dernière annotation manuelle. (d) dernière segmentation issue des annotation réalisées. Légende de segmentation : cyan = arrière-plan, jaune = feuille non nécrosée, rouge = nécrose et bleu = conidies



Figure 10 : Plante d'*Arabidopsis* au stade feuille de rosette traitées par un inoculum. Illustration de l'hétérogénéité de la hauteur du substrat, de l'inclinaison des feuilles et de l'arrière-plan dans le cas d'une présentation du matériel biologique dans des godets de culture.

feuilles contient 3 classes : arrière-plan (cyan), feuille (jaune) et nécrose (rouge), tandis que celui développé pour analyser les photos de plantules en contient une de plus : conidies (bleu). Reposant sur un principe de machine learning, il a fallu entraîner ces modèles à plusieurs reprises, par succession d'annotations manuelles et par segmentations automatiques (générées grâce aux apprentissages des modèles). L'objectif des annotations est de colorier manuellement des pixels appartenant aux différentes classes présentes sur la photo afin d'apprendre aux modèles à reconnaître les classes. Une attention particulière est portée aux jonctions inter-classes, ainsi qu'aux éléments inhabituels tels que les reflets ou les variations de couleur. À cette fin, quelques photos ont été réalisées pour illustrer le principe d'entraînement du modèle de segmentation des photos de feuilles (Figure 8) et de plantules (Figure 9).

Deux scripts d'analyses, contenant ces modèles de segmentation, ont également été paramétrés. Ces derniers, intitulés « image analysis – nécroses sur feuille » et « image analysis – conidies + nécroses sur plantule », permettent d'ajuster, via des filtres, la segmentation effectuée par les modèles et de réaliser des mesures sur les objets segmentés (circularité, aire, etc.). Les détails concernant le paramétrage des modèles de segmentation ainsi que des scripts d'analyses sont donnés dans les parties 3.2.3 et 3.3.3.

Une fois les modèles entraînés et les scripts paramétrés, les images pourront être analysées grâce à l'onglet Processus du logiciel. Pour cela il suffit de sélectionner une méthode et de la paramétrer selon les disponibilités. Dans le cadre de ce projet nous utiliserons la méthode « Analyse Batch to file » qui permet d'analyser plusieurs images simultanément et d'en sortir automatiquement les mesures dans un fichier de sortie.



Figure 11 : Echantillonnage des feuilles de rosette inoculées (6 DAI) sur boîte de Pétri pour la prise d'image.

Les couleurs sur les pétioles correspondent à des repères placés pour identifier les feuilles inoculées avec de l'eau (bleu) et par Abra43 (rouge). Le nom de la lignée mutante (voir tableau 1) est inscrit au marqueur dans le bas de la boîte de Petri

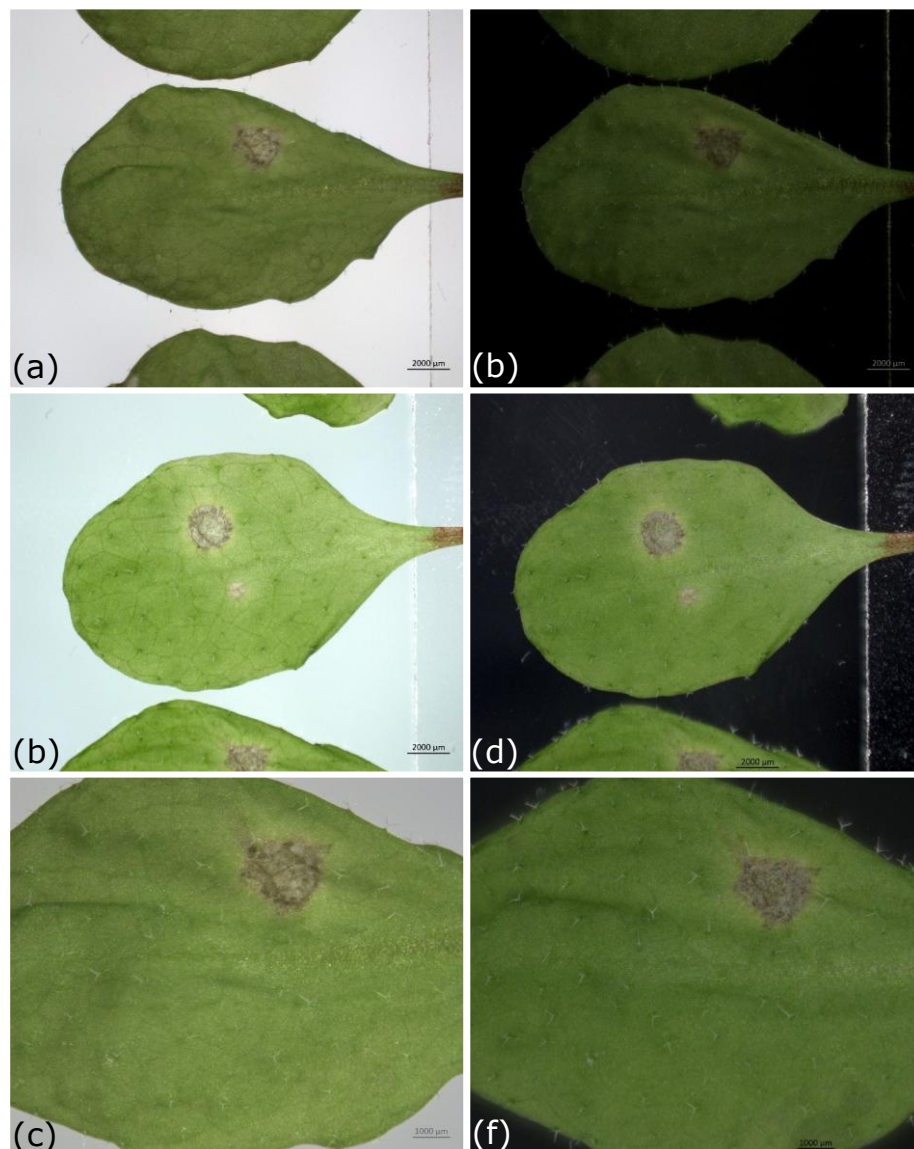


Figure 12 : Comparaison des prises de vues des feuilles de rosette dans les différentes conditions de réglage du macroscopes.

Différents paramètres de couleur du fond, d'éclairage, et d'objectif ont été comparés pour l'acquisition des feuilles de rosette d'*A. thaliana* à 6 DAI. (a) Fond clair avec éclairage col de cygne, objectif 0,5x et GF X4. (b) Fond noir avec éclairage col de cygne, objectif 0,5x et GF X4. (c) Fond clair avec éclairage annulaire, objectif 0,5x et GF X4. (d) Fond noir avec éclairage annulaire, objectif 0,5x et GF X4. (e) Fond clair avec éclairage annulaire, objectif 1x et GF X7. (f) Fond clair avec éclairage annulaire, objectif 1x et GF X7.



## 3. RESULTATS

### 3.2. ROSETTES

#### 3.2.1. Montage expérimental

*L'acquisition des images (prise de vue, zoom, plan focale, temps d'acquisition, etc.) et leur analyse (netteté, contraste des objets à segmenter, etc.), doivent être pensées et anticipées lors de la préparation des échantillons, au risque de ralentir et de perturber ces deux processus. Concernant l'acquisition et l'analyse par segmentation des feuilles de rosette, l'utilisation directe des godets de culture s'est montrée inappropriée à cause d'une variabilité dans la hauteur du substrat, la hauteur et l'inclinaison des feuilles et l'hétérogénéité de l'arrière-plan (Figure 10). Pour pallier cet écueil, les feuilles de rosette inoculées sont découpées au niveau de leur pétiole juste avant l'acquisition, et scotchées au fond d'une boîte de Petri carrée (format 120x120x13mm). Les feuilles sont disposées (12 par boîte de Petri) en veillant à ce qu'elles soient suffisamment espacées pour assurer des prises de vues individuelles (*

Figure 11). Ce montage s'est montré optimal pour réduire les écarts de mise au point entre les prises de vues, accélérant ainsi le temps d'acquisition. De plus, l'utilisation d'un arrière-plan uni assure un rendu visuel homogène qui facilitera les étapes de segmentation au moment de l'analyse.

*Le temps nécessaire pour effectuer le montage d'une boîte a été chronométré sur huit répétitions, afin d'évaluer la rapidité du protocole d'acquisition associé à l'outil. En moyenne, une boîte est préparée en 5 minutes 30 secondes, avec un écart type de 1 minute 20 en fonction de l'état des feuilles.*

#### 3.2.2. Prise d'images

Une fois le montage réalisé, des prises de vue des feuilles sont réalisées à l'aide du microscope. Une série d'essais a permis de déterminer les meilleurs réglages de couleur du fond, de luminosité et de choix d'objectif (Figure 12).

Comme le montre la Figure 12, le fond blanc étant réalisé grâce à un éclairage par transmission, il permet de visualiser davantage les nervures et les trichomes (Figure 12 a, c, e). Néanmoins, le fond noir permet d'obtenir des nécroses avec moins de variation de couleurs et des bords plus visibles, ce qui devrait faciliter la segmentation réalisée par le modèle d'apprentissage durant la phase d'analyse d'image (Figure 12 b, d, f). Comparé à système d'éclairage par col de cygne (Figure 12 a, b), l'utilisation de la lampe annulaire produit des prises de vues des échantillons plus lumineuses et avec moins de zones ombrées (Figure 12 c, d, e, f). Les nécroses s'en trouvent mieux délimitées sur les photos. Les deux objectifs testés permettent de visualiser les nécroses de manières similaires et avec une définition suffisante. Toutefois, les photos réalisées avec l'objectif 0,5x et un grossissement final (GF) de X4 (Figure 12 a, b, c, d), permettent de visualiser davantage les feuilles d'*A. thaliana* et avec une plus grande profondeur de champ, ce qui peut s'avérer plus polyvalent dans le cas de symptômes nécrotiques très étendus ou dispersés sur la feuille.

La condition optimale pour l'acquisition des feuilles à 6 DAI semble être sur fond noir avec un éclairage annulaire et l'objectif 0,5x pour un GF X4. La mise au point

peut être automatisée, mais en raison de l'irrégularité de certaines feuilles, une vérification manuelle reste nécessaire pour s'assurer que la nécrose se trouve bien dans le plan le plus net. L'éclairage annulaire est réglé sur son intensité maximale, moins 4 crans, et la balance des blancs est réalisée sur papier de type post-it blanc. Le contraste est optimisé par une exposition corrigée avec une valeur des noirs de 50 et une valeur des blancs de 3000.

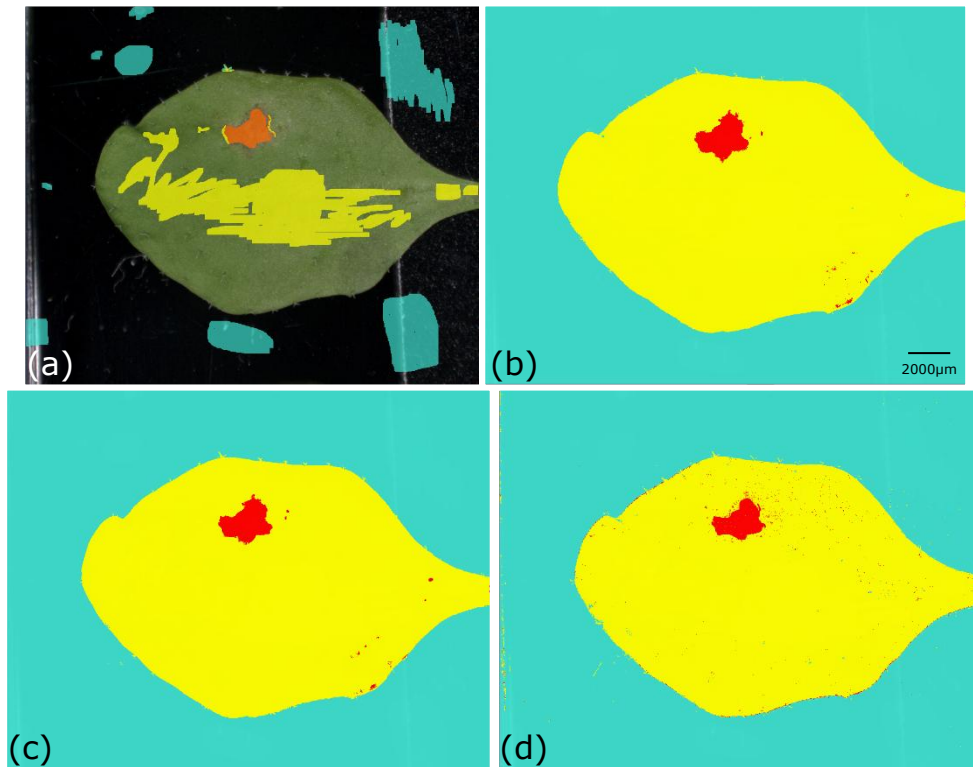


Figure 13 : Segmentation d'un feuille de rosette en fonction de différents valeurs de BF. (a) Annotation manuelle pour entrainer le modèle. Segmentation automatique basée sur l'entraînement, réalisée avec (b) BF 25, (c) BF 33 ou (d) BF 50. Légende de segmentation : cyan = arrière-plan, jaune = feuille non nécrosée, rouge/orange = nécrose. La photo initiale a été prise selon les condition optimales définies pour l'acquisition des feuilles de rosette

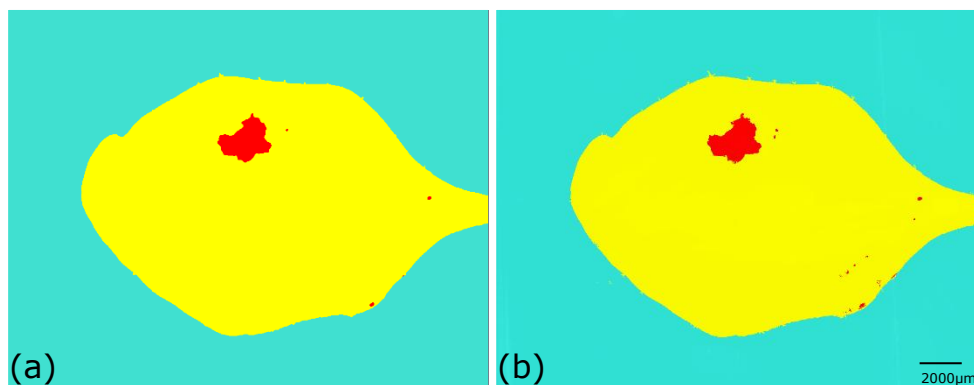


Figure 14 : Segmentation d'un feuille de rosette (a) avec ou (b) sans post-traitement BRF. Les 2 segmentations ont été réalisées avec une BF 33. Légende de segmentation : cyan = arrière-plan, jaune = feuille non nécrosée, rouge = nécrose. La photo initiale a été prise selon les condition optimales définies pour l'acquisition des feuilles de rosette.

*Le temps d'acquisition (intégrant la mise au point automatique, la vérification du plan net, d'éventuelles corrections liées à des imperfections comme des enroulements de feuilles) est de 12 minutes 30 ± 1 minute 44 par boîte contenant 12 feuilles (moyenne évaluée sur dix boîtes).*

### 3.2.3. Analyse d'images

L'analyse d'image a nécessité le développement d'un modèle intelligent de segmentation par classification de pixel, basé sur du machine learning, appelé « trained model – nécroses sur feuilles V2 ». Pour rappel, le modèle contient trois classes : arrière-plan (cyan), feuille (jaune) et nécrose (rouge). Sur ce modèle, 2 paramètres peuvent être réglés en plus de l'entraînement manuel réalisé :

- Le paramètre Basic Features (BF) permet de choisir le nombre de filtres utilisés par le modèle (BF 25, BF 33, BF 50, etc.) pour le choix d'attribution d'un pixel à une classe. Une valeur faible privilégie généralement l'analyse de grandes structures globales, tandis qu'une valeur élevée permet l'analyse de petits détails.
- L'algorithme de post-traitement Conditional Random Field (CRF) s'appuie sur la position des pixels voisins pour affiner les contours des régions segmentées et produire un résultat plus cohérent spatialement.

Ces deux paramètres de segmentation ont été testés séparément au sein d'un modèle semi-entraîné, selon deux approches complémentaires :

- Un modèle semi-entraîné construit à partir de différents paramètres de BF (Figure 13). Les résultats obtenus montrent que la photo segmentée avec une BF 50 présente beaucoup de bruit de fond (Figure 13 d, illustrant la présence de pixels rouges et cyans isolés sur la surface jaune). Les segmentations obtenues avec les paramètres BF 25 et BF 33 sont relativement similaires. Malgré un bon détournement de la nécrose, la segmentation réalisée avec une BF 25 (Figure 13 b) présente un peu plus de bruit de fond que celle réalisée avec une BF 33 (Figure 13 c).
- Un modèle de segmentation semi-entraîné, avec ou sans application du post-traitement CRF (Figure 14). Les images ont été générées en utilisant un paramètre BF 33, précédemment identifié comme le plus performant. L'image traitée avec CRF (Figure 14 a) présente une réduction du bruit de fond marquée par rapport à celle obtenue sans post-traitement (Figure 14 b). Les contours de la feuille et des nécroses apparaissent également plus lissés, sans pour autant modifier de manière significative les surfaces segmentées de ces deux structures.

L'utilisation de Basic Feature 33 couplé à un post-traitement par CRF permet d'améliorer significativement la qualité de la segmentation. Toutefois, malgré l'entraînement effectué à partir de 13 images, certains pixels demeurent mal segmentés. Un apprentissage plus approfondi devrait permettre de limiter les bruits de fond ou les erreurs de détournement.

Pour affiner la segmentation du modèle grâce à des filtres propres à chaque classe et sélectionner des caractéristiques à mesurer, un script d'analyse intitulé « image analysis – nécroses sur feuille » a été développé. Dans un premier temps, des filtres de segmentation, permettant de réajuster l'attribution de certains objets mal classés, ont été appliqués :

- Feuille : taille minimale des objets fixée à 1 000 unités ; suppression des trous internes de moins de 50 unités.
- Arrière-plan : exclusion des objets de moins de 700 unités ; activation du comblement automatique des trous pour éviter les artefacts de l'arrière-plan

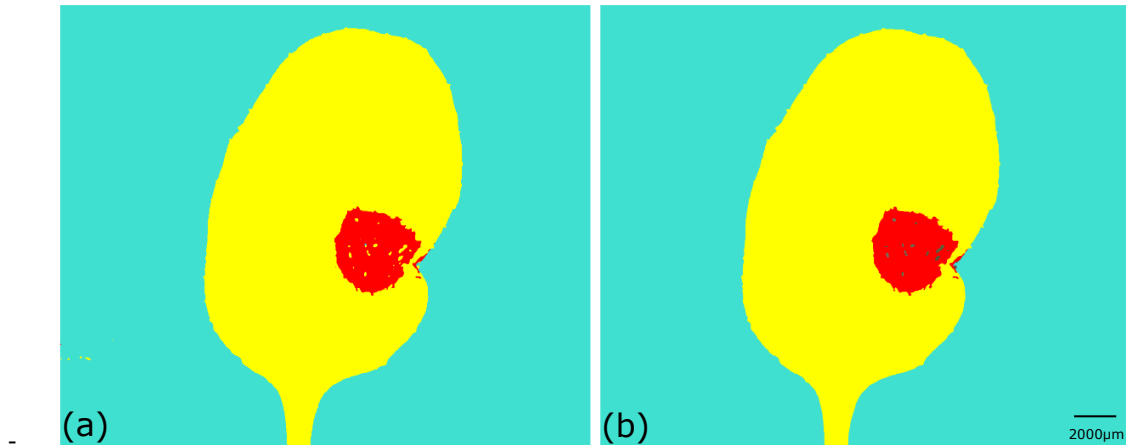


Figure 15 : Segmentation d'une feuille de rosette réalisée (a) uniquement par le modèle de segmentation, (b) par le modèle de segmentation couplé au script d'analyse.  
Légende de segmentation : cyan = arrière-plan, jaune = feuille non nécrosée, rouge = nécrose. La photo initiale a été prise selon les condition optimales définies pour l'acquisition des plantules.

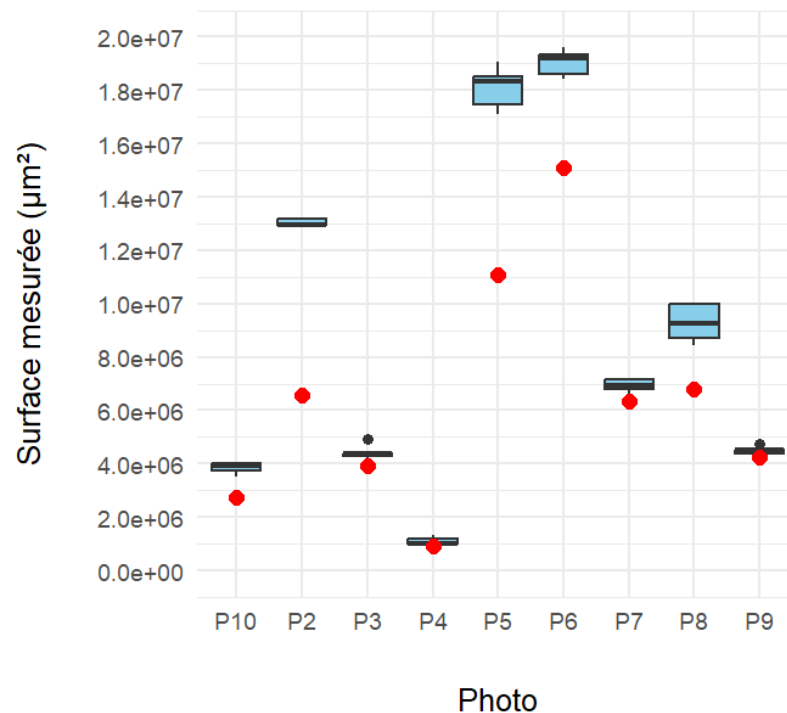


Figure 16 : Représentation graphique des surfaces de nécroses mesurées manuellement (en bleu) et par l'outil automatisé sur le logiciel ZEN (en rouge). Les mesures ont été réalisées sur 9 images, nommées de P2 à P10. Les mesures manuelles ont été effectuées sur Image J par cinq expérimentateurs aux niveaux d'expérience variés.



- Nécrose : seuil minimal fixé à 50 unités pour la taille des objets et des trous, afin de ne pas éliminer les lésions de petite taille, tout en évitant la présence de pixels mal segmentés au sein des nécroses.

Toutes les valeurs sont exprimées dans l'unité arbitraire du logiciel ZEN. Ces réglages assurent un filtrage standardisé, tout en conservant la sensibilité nécessaire à la détection des structures d'intérêt. Néanmoins, les filtres de segmentation disponibles dans le logiciel restent relativement peu nombreux et présentent une précision limitée. Pour pallier ces limites, des filtres de région, qui excluent de l'analyse les objets ne répondant pas à certains critères définis, ont également été appliqués. Les paramètres retenus pour les 3 classes de segmentation sont :

- Feuille : aire minimale fixée à 1 000 000  $\mu\text{m}^2$ , afin d'éliminer les zones mal segmentées qui pourraient être confondues avec des fragments de feuille.
- Arrière-plan : seuil fixé à 48 000  $\mu\text{m}^2$ , permettant d'exclure les petites zones mal segmentées situées à la surface des feuilles, tout en conservant la possibilité de détecter de véritables trous laissant apparaître l'arrière-plan à travers le limbe.
- Nécrose : aire minimale définie à 5 000  $\mu\text{m}^2$ , ce qui permet de conserver les lésions visibles tout en éliminant les artefacts mineurs.

L'application des filtres a permis de corriger des incohérences de segmentation. La Figure 15 montre par exemple l'exclusion des pixels jaunes mal segmentés sur la nécrose. Ces erreurs restent toutefois marginales et n'affectent pas énormément les mesures. L'amélioration du modèle reste nécessaire pour affiner les résultats.

Les caractéristiques de mesures sélectionnées sont le nombre d'objets par classe et la surface cumulée des objets appartenant à chaque classe. Ces deux paramètres permettent de quantifier à la fois le nombre et la surface totale des nécroses sur chaque feuille de rosette. Ils offrent également un moyen rapide de contrôler la cohérence des classes 'feuille' et 'arrière-plan', afin de détecter d'éventuelles erreurs de segmentation.

*Le temps d'analyse par la méthode « Analyse Batch to file » (onglet « Processus ») est de 7 minutes pour segmenter 9 photos présentant des nécroses particulièrement importantes. Cette méthode permet d'obtenir, image par image, un tableau des surfaces cumulées de chaque classe du modèle. Pour comparer le temps d'analyse et la qualité de la segmentation réalisée par le modèle, une analyse manuelle a été effectuée. Les mêmes 9 photos ont été analysées à l'aide du logiciel ImageJ par cinq opérateurs, plus ou moins expérimentés avec le logiciel (Figure 16). Le temps de segmentation manuel est 4 minutes 48 secondes pour les neuf images, auquel il faut ajouter 1 minute 30 pour la conversion du format des images, soit 6 minutes 18 secondes, avec un écart type de 1 minute 49.*

Sur ces neuf photos, cinq segmentations (P10, P2, P5, P6 et P8, Figure 16) réalisées par le modèle ont montré une sous-estimation importante de la surface de nécrose, à cause d'une détection incomplète. Les segmentations manuelles se sont donc révélées plus précises que celles produites par le modèle (Figure 16). Ces résultats indiquent que le modèle, en l'état actuel, nécessite donc encore d'être entraîné pour atteindre une performance satisfaisante.

### 3.3. PLANTULES

#### 3.3.1. Montage expérimental

Concernant l'acquisition et l'analyse des images de plantules et des symptômes associés, la phase de semis et d'incubation des graines a été optimisée.

Dans le but d'analyser à la fois les nécroses et les conidies qui ne sont généralement pas situées dans le même plan, l'inclinaison des boîtes de pétri utilisées pour les semis a été testée. Une boîte de Pétri contenant les graines semées a été

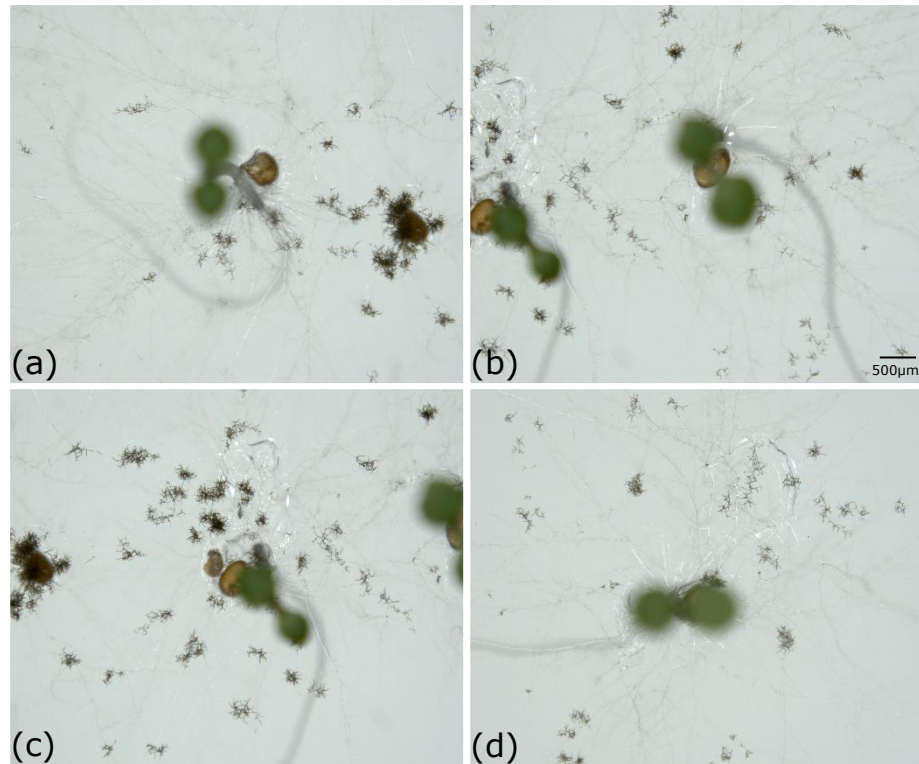


Figure 17 : Prises de vue de plantules à 6 DAI ayant poussées sur une boîte orientée à 180°. Les photos ont été prises avec l'objectif 1x avec un GF X12,5. La balance des blancs a été réalisée sur un post-it blanc

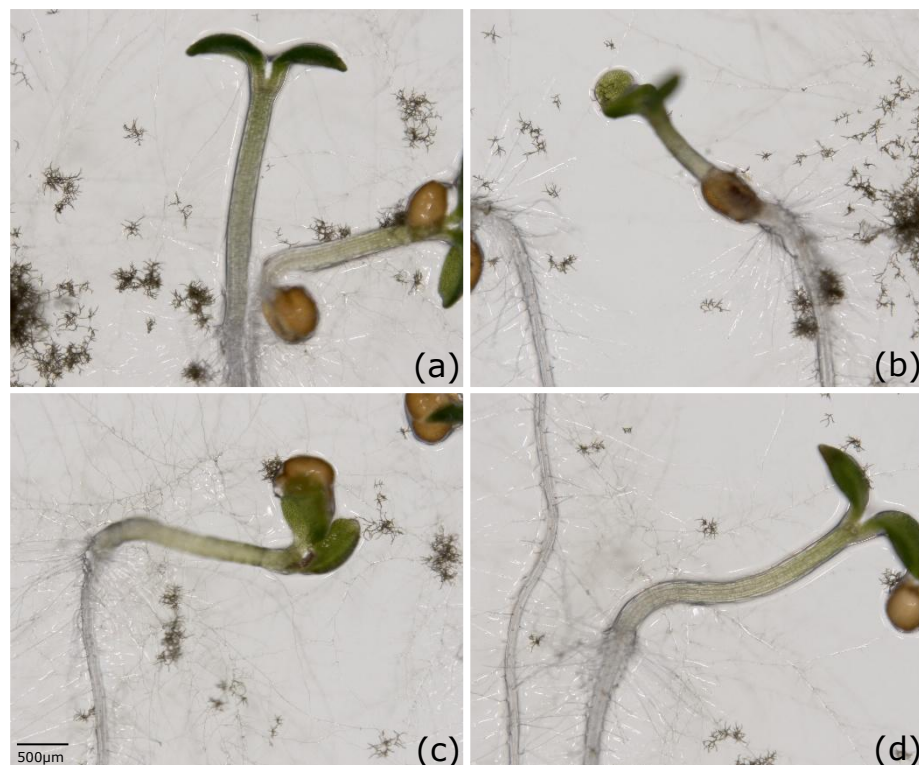


Figure 18 : Prises de vue de plantules à 6 DAI ayant poussées sur une boîte orientée à 90°. Les photos ont été prises avec l'objectif 1x avec un GF X20. La balance des blancs a été réalisée sur la gélose vierge

placée en chambre de culture à la verticale (90°) et une autre a été placée classiquement à l'horizontale (180°). Les conidies apparaissent nettes et bien définies, quelle que soit l'inclinaison de la boîte de Pétri. Cependant, les boîtes inclinées à 180° (grossissement final X12,5) produisent des acquisitions (Figure 17) dans lesquelles l'hypocotyle des plantules est majoritairement masqué par les cotylédons, lesquels ne peuvent pas être nets en même temps que les conidies présentes sur la gélose. Dans ces conditions, l'observation des nécroses s'avère donc limitée. Les photos obtenues à partir de la boîte placée à 90° (Figure 18, GF X20) montrent en revanche des plantules avec des cotylédons et un hypocotyle globalement plus nets, facilitant ainsi la détection simultanée des symptômes nécrotiques et des conidies, comme illustré Figure 18 d. Enfin, les couleurs obtenues paraissent plus naturelles lorsque la balance des blancs est effectuée sur la gélose vierge (Figure 18), comparativement à celles obtenues avec une balance des blancs calibrée sur un post-it blanc (Figure 17).

La condition de mise en culture des boîtes à 90° a donc été retenue pour la suite du développement de l'outil de phénotypage.

Un plan de semis a également été testé (Figure 19) et des prises de vues ont été réalisées (Figure 20) pour évaluer différentes organisations spatiales de dépôts de graines. L'objectif est de pouvoir identifier quels espacements offrent les meilleures conditions pour l'acquisition des photos.

La Figure 20 montre que les semis en croix ou en carré réalisés avec un espacement d'un carreau produisent généralement des plantules trop proches les unes des autres (Figure 20 a. b. c). Cela peut entraîner des chevauchements et rend souvent difficile l'identification de l'origine des conidies observées sur la gélose, ce qui peut introduire des biais dans l'analyse. À l'inverse, les semis réalisés en croix ou en carré avec un espacement supérieur à un carreau produisent des plantules trop éloignées les unes des autres pour être photographiées simultanément, tout en permettant une identification claire des nécroses et des conidies. Des résultats similaires ont également été obtenus sur les semis réalisés en triangle qui n'ont donc pas été illustrés. En revanche, les semis réalisés en lignes avec un espacement de 1,5 carreau minimum ont permis des acquisitions individuelles de plantules avec un GF X20 (Figure 20 d). Dans ces conditions, les chainettes de conidies étaient clairement identifiables et d'éventuelles nécroses pourraient facilement être observées.

Ainsi, le plan de semi retenu pour la suite de l'analyse est un semi en ligne avec des espacements de 3 carreaux à l'horizontale et de 6 carreaux à la verticale (Figure 21). Ce dernier permet de réduire au maximum les potentiels chevauchements dus aux longues racines des plantules se développant sur les boîtes à 90°. Ce plan permet ainsi de semer 30 graines par boîte.

### 3.3.2. Prise d'images

Peu de nécroses ont été observées à 6 DAI, nous avons donc décidé d'optimiser les prises de vues sur des plantules à 10 DAI. L'objectif de la prise d'image était de calibrer le grossissement des prises de vue (GF X20 ou X16) et la profondeur de champ (paramétrage des prises de vue Z-stack) pour obtenir un temps d'acquisition minimal et permettant une analyse fiable des symptômes.

Tel qu'illustré Figure 22, le grossissement X16 permet d'identifier les nécroses et les conidies aussi distinctement que le grossissement X20. En revanche, le GF X16 offre un champ de vision plus important autour de la plantule. Le GF X16 apparaît donc comme une option plus adaptée pour le calibrage de la prise d'images sur plantules à 10 DAI, car il permet d'observer un nombre de conidies plus représentatif du niveau d'infection et de limiter le risque qu'une plantule de grande taille sorte du champ.

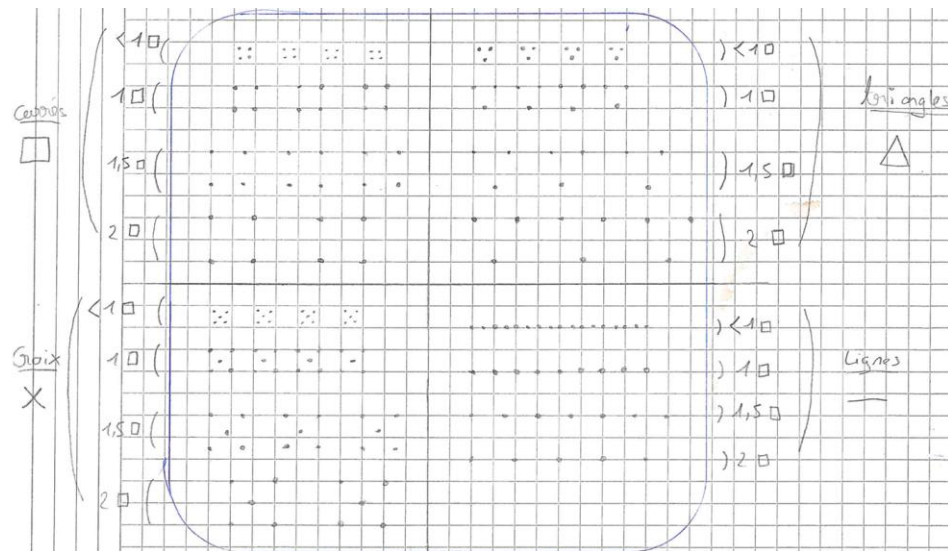


Figure 19 : Plan de semis test contenant des dispositions de graines différentes. La ligne bleue représente le fond d'une boîte de Petri carré de format 120mmx120mm. Les points gris représentent les endroits où les graines d'*A. thaliana* sont déposées. Les chiffres disposés le long de la ligne bleue correspondent aux espacements testés (0,5 ; 1 ; 1,5 et 2 carreaux).



Figure 20 : Prises de vues comparant différents profils d'agencements de plantules à 6 DAI. (a) semis en carré avec un espacement de 1 carreau, photo réalisée à l'objectif 1x avec un GF X7. (b) semis en croix avec un espacement de 1 carreau, photo réalisée à l'objectif 1x avec un GF X7. (c) semis en croix avec un espacement de 1 carreau, photo réalisée à l'objectif 1x avec un GF X12,5. (d) semis en ligne avec un espacement de 1,5 carreau ou plus, photo réalisée à l'objectif 1x avec un GF X20



Des comparaisons entre des photos prises sur un seul plan focal et des photos compilées de prises de vue sur plusieurs plans focaux (Z-stack) permettent de constater que les conidies sont bien visibles dans les 2 conditions (Figure 23 a et Figure 23 b, c et d). Cependant, les images issues des compilations de prises de vue sur plusieurs plans permettent d'éliminer totalement les zones de flou au niveau des cotylédons et des conidies sur la radicule. Ce type d'acquisition a été retenu, car il offre une meilleure distinction des conidies et des nécroses présentes sur la plantule. En revanche, cette exploitation du Z-stack pour améliorer la profondeur de champ nécessite un traitement d'image par "extended depth focus" (EDF) qui permet de fusionner plusieurs plans focaux en une seule image, en conservant les zones les plus nettes de chaque prise de vue. Ce traitement peut être réalisé selon différentes méthodes : contraste, variance et "wavelet" (illustrées dans la Figure 23). Les tests réalisés ont permis de mettre en évidence que la méthode par contraste génère un détournement peu précis des conidies (Figure 23 b.) et que la méthode par wavelet (Figure 23 d.) induit de forts artéfacts directement sur la plantule. En revanche, la méthode par variance (Figure 23 c.) tend à produire des contours de plantules légèrement flous, mais permet un détournement très précis des conidies, sans artéfacts notables. Dans ce contexte, la méthode par variance apparaît comme la plus adaptée pour alimenter le modèle de segmentation, en raison de sa capacité à isoler fidèlement les conidies tout en limitant les bruits parasites.

Néanmoins, l'exploitation du Z-stack pour améliorer la profondeur de champ demeure relativement longue, car elle implique la capture de plusieurs images successives. Afin de réduire le temps d'acquisition, le nombre de prises de vue a cherché à être limité, tout en maintenant une qualité d'image suffisante pour l'analyse. La Figure 24 illustre que les trois prises de vues réalisées avec 30, 20 et 13 images issues de plans focaux différents (Figure 24 a, b et c), ne présentent aucune différence visible en termes de netteté. Ce résultat s'explique par la profondeur de champ, estimée à 110  $\mu\text{m}$  dans les conditions utilisées (objectif 1x avec un grossissement final de X16). Il est donc théoriquement possible de couvrir une plage de 1200  $\mu\text{m}$  sur l'axe Z en ne réalisant que 11 prises de vue, avec un intervalle d'environ 109  $\mu\text{m}$ , puisque ce pas reste inférieur à la profondeur de champ.

L'acquisition plante à plante a pu être semi-automatisée grâce à une étape de prévisualisation de la boîte permettant un enregistrement manuel des coordonnées X et Y des plantules à photographier par un simple clic. Une mise au point automatique est ensuite effectuée sur chacune des positions, afin de déterminer la coordonnée Z correspondant à la surface de la gélose. Les images sont par la suite capturées automatiquement à l'objectif 1x, avec un GFX16. Pour chaque plantule, un empilement de 15 images est réalisé sur une hauteur de 1300  $\mu\text{m}$ , avec un intervalle de 93  $\mu\text{m}$  entre chaque plan focal. Un décalage initial de 557  $\mu\text{m}$  est appliqué de manière à ce qu'une seule image soit prise juste en dessous du plan de la gélose, tandis que les suivantes couvrent l'ensemble de la plantule, optimisant ainsi la capture des structures d'intérêt. Ces paramètres permettent de garantir l'acquisition d'une plantule nette dans la grande majorité des cas. L'éclairage repose sur deux sources complémentaires. Un éclairage par réflexion, assuré par une lampe annulaire (intensité maximale diminuée de quatre crans pour éviter la surexposition) et un éclairage par transmission, activé via la base pour améliorer la détection des conidies sur la gélose (créant ainsi un fond blanc). Le contraste des photos est également amélioré avec une valeur d'exposition réglée à 50 pour les noirs et à 3000 pour les blancs.

*Le traitement d'une boîte contenant 30 plantules prend environ 40 minutes (mesuré sur cinq boîtes). Ce temps inclut la calibration de la position, la recherche du plan net (focus), l'acquisition en Z-stack des 15 photos, ainsi que le traitement EDF pour chaque plantule.*

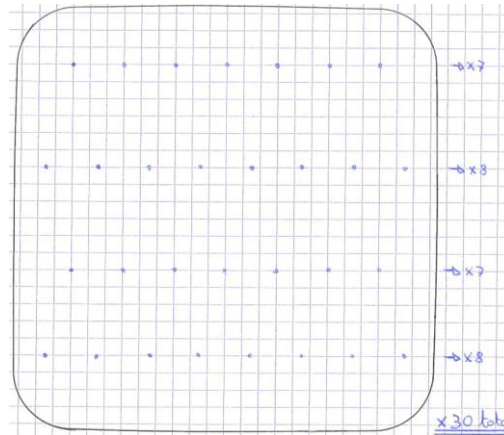


Figure 21 : Plan de semis final, permettant d'analyser de 30 graines par boîte de Pétri carré (120mmx120mm). Les points bleus représentent les endroits où les graines d'*A.thaliana* sont déposés. Les chiffres disposés le long de la ligne bleue correspondent au nombre de graines pouvant être semées par ligne.

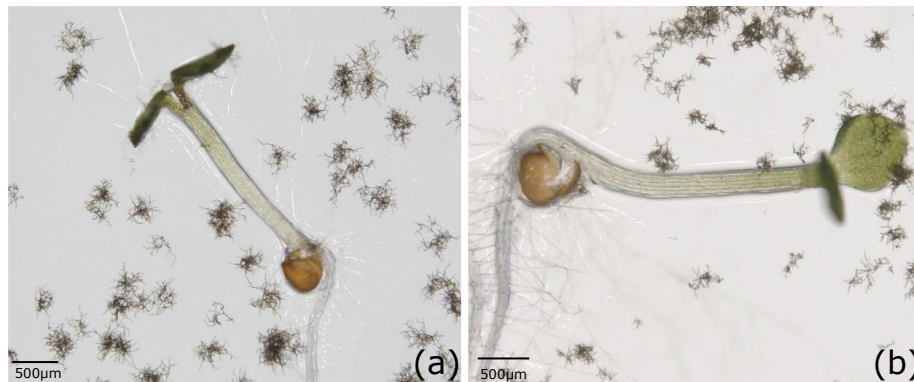


Figure 22 : Prises de vue de plantules à 10 DAI avec l'objectif 1x pour un GF (a) X16 et (b) X20.

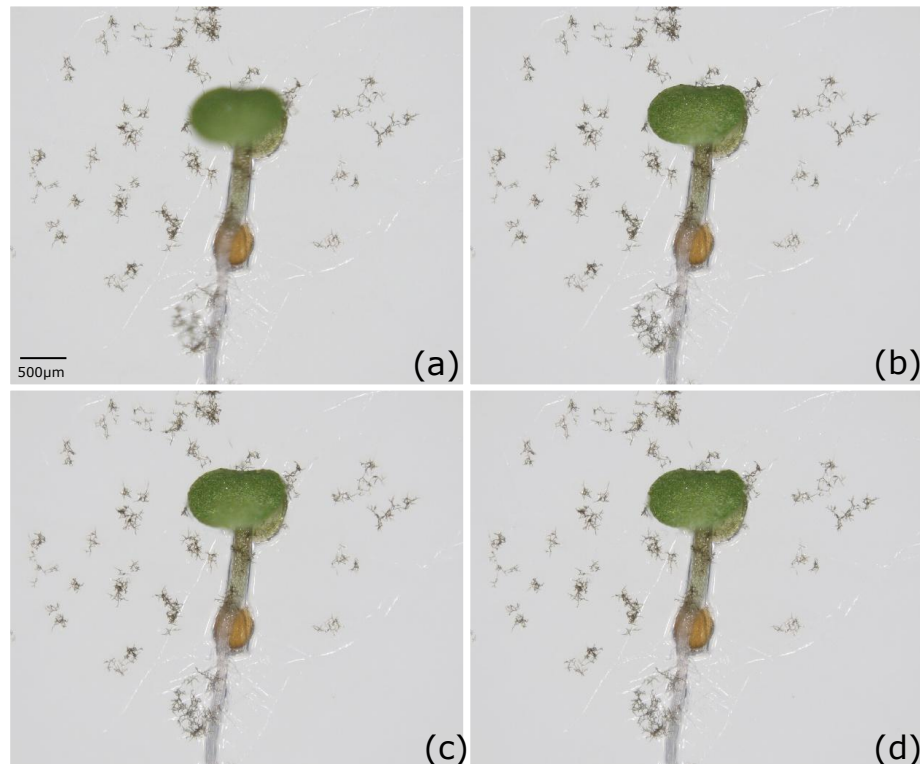


Figure 23 : Prises de vues d'une plantule à 10 DAI (a) en un seul plan ou avec plusieurs plan focaux (30 images) fusionnés avec un traitement EDF par (b) contraste, (c) variance, (d) wavelet. Les photos ont été réalisées avec l'objectif 1x au GF X16.

### 3.3.3. Analyse d'images

L'analyse des images de plantules a nécessité le développement d'un modèle intelligent de segmentation par classification de pixels, basé sur du machine learning. Ce modèle, nommé « trained model – conidies + nécroses sur plantule », contient quatre classes : arrière-plan (cyan), feuille (jaune), nécrose (rouge) et conidie (bleue). À l'image du modèle développé sur feuille de rosette, les deux mêmes paramètres peuvent être réglés : Basic Features (BF) et Conditional Random Field (CRF). Afin d'identifier la combinaison optimale pour le développement de cet outil, plusieurs prises de vue ont été réalisées (Figure 24 et Figure 26).

Il est constaté que les nécroses sont bien identifiées, quel que soit le niveau de BF utilisé (Figure 24 b, c et d). En revanche, des différences apparaissent concernant les reflets sur la gélose, les contours de la plantule et les chaînes de conidies, selon la valeur du paramètre. Avec le paramètre BF 50 (Figure 24 d), de nombreux pixels jaunes sont mal segmentés, notamment au niveau des conidies et des reflets sur la gélose. La segmentation de la plantule elle-même est moins précise, car plusieurs pixels cyan sont attribués à tort à sa surface. Avec BF 25 (Figure 24 b), les reflets de la gélose ne perturbent plus la segmentation. En revanche, certains groupes de pixels jaunes apparaissent encore sur les conidies, réduisant artificiellement leur surface. On observe également quelques erreurs de segmentation (pixels bleus mal placés) sur les bords de l'hypocotyle. Enfin, la segmentation obtenue avec BF 33 (Figure 24 c) semble la plus précise (avec moins de pixels jaunes sur les conidies tout en conservant une identification claire de la plantule et des structures fongiques). BF 33 sera donc la méthode retenue.

La Figure 26 illustre la segmentation d'une plantule par un modèle semi-entraîné, avec ou sans application du post-traitement CRF. Les images ont été produites en utilisant un paramètre BF 33, condition ayant donné les meilleurs résultats lors des tests précédents. L'image avec post-traitement CRF (Figure 26 a) présente globalement moins de bruit de fond. La segmentation de la plantule y apparaît plus nette, avec une forte réduction des erreurs de classification, notamment au niveau de l'hypocotyle (réduction des pixels bleus mal attribués). En revanche, la segmentation des conidies conduit à surestimer leur surface.

Les résultats obtenus ont permis d'identifier les paramètres permettant une segmentation satisfaisante sur plantules, à savoir l'utilisation du BF 33, sans application du post-traitement CRF. Cette configuration offre une segmentation de bonne qualité, avec des surfaces estimées proches de la réalité et peu biaisées. Cependant, le modèle nécessite un entraînement plus important basé sur d'autres images de plantule, afin d'intégrer davantage de diversité dans le but d'améliorer sa robustesse.

L'analyse des images de plantules a également nécessité la création d'un script spécifique, intitulé « image analysis – conidies + nécroses sur plantule ». Sur le même principe que celui utilisé pour les nécroses sur feuille, ce script permet d'affiner la segmentation en appliquant des filtres propres à chaque classe et en sélectionnant les caractéristiques à mesurer. Des filtres de segmentation ont ainsi été appliqués aux trois classes définies, afin de corriger certaines erreurs d'attribution post-segmentation :

- Nécrose : seuil minimal fixé à 75 unités pour la taille des objets et des trous, afin de conserver les lésions de petite taille tout en limitant les erreurs de classification internes.
- Arrière-plan : aucun objet exclu, certains petits éléments étant imbriqués dans les conidies. Le comblement automatique des trous a toutefois été activé pour limiter la présence de pixels jaunes résiduels.
- Plantule : taille minimale fixée à 1 000 unités, avec suppression des trous internes de moins de 75 unités, permettant d'éliminer la majorité des pixels jaunes sur l'arrière-plan ainsi que les cyan résiduels sur l'hypocotyle.



Figure 24 : Z-stacks d'une plantule à 10 DAI réalisés avec (a) 30 photos ; (b) 20 photos et (c) 13 photos  
Les images ont ensuite été compilées en EDF selon la méthode variance. Les trois Z-stacks ont été réalisés avec l'objectif 1x au GF X16

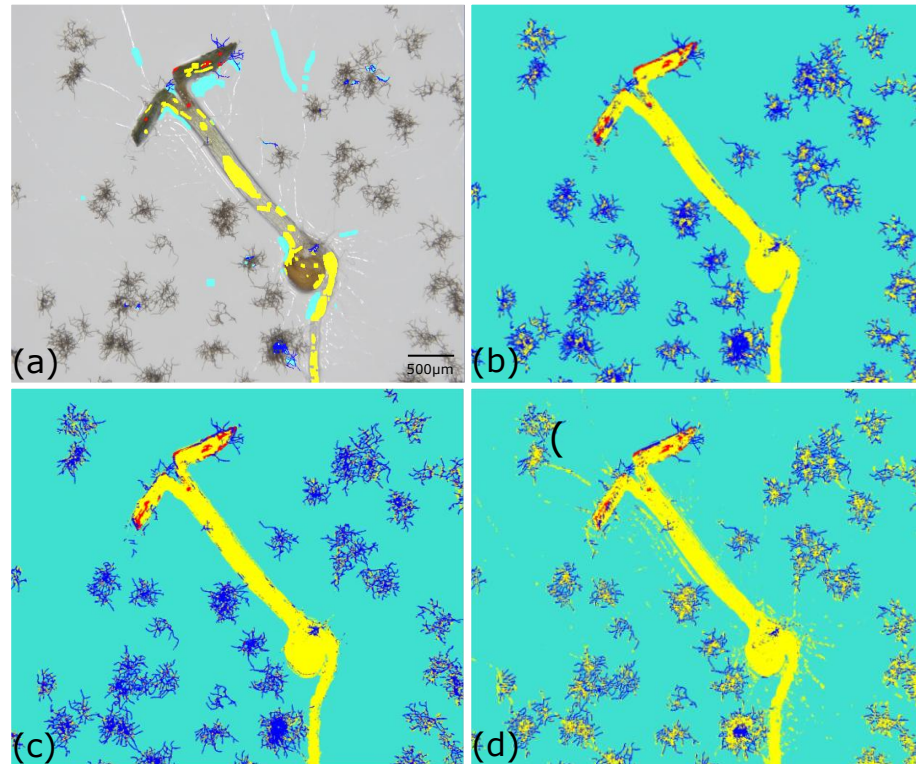


Figure 25 : Segmentation d'une plantule en fonction de différents valeurs de BF.  
(a) Annotation manuelle pour entraîner le modèle. Segmentation automatique basée sur l'entraînement, réalisée avec (b) BF 25, (c) BF 33 ou (d) BF 50. Légende de segmentation : cyan = arrière-plan, jaune = feuille non nécrosée, rouge = nécrose, bleu = conidies. La photo initiale a été prise selon les conditions définies pour l'acquisition des plantules.



- Conidies : seuil de taille fixé à 100 unités, car la plupart des objets pertinents appartenant à cette classe dépassent ce seuil.

Toutes les valeurs sont exprimées dans l'unité arbitraire du logiciel ZEN. Les réglages permettent un filtrage cohérent, malgré un nombre de filtres restreint et une précision perfectible. Contrairement à l'analyse sur feuilles de rosette, aucun filtre de région n'a été appliqué ici, leur utilisation étant jugée trop délicate au vu de la morphologie hétérogène des objets segmentés (risque de faux négatifs).

Par ailleurs, la Figure 27 : Segmentation d'une plantule réalisée **(a)** uniquement par le modèle de segmentation, **(b)** par le modèle de segmentation couplé au script d'analyse., illustrant une photo de plantule segmentée avec et sans filtre, met en évidence le fait que les filtres améliorent nettement la segmentation, en reclassant les pixels jaunes mal segmentés au niveau des conidies ainsi qu'une grande partie des pixels cyan et bleus présents sur la plantule. Le script d'analyse développé semble ainsi abouti.

Comme pour le script utilisé pour les feuilles de rosette, les mesures retenues sont le nombre d'objets par classe et leur surface cumulée. Ces paramètres permettent de quantifier le nombre et la surface des nécroses, ainsi que la surface des conidies sur chaque image.

Des comparaisons avec des analyses manuelles restent à réaliser dans le cas des plantules. Ce test permettra d'évaluer la rapidité et la qualité de segmentation de cet outil.

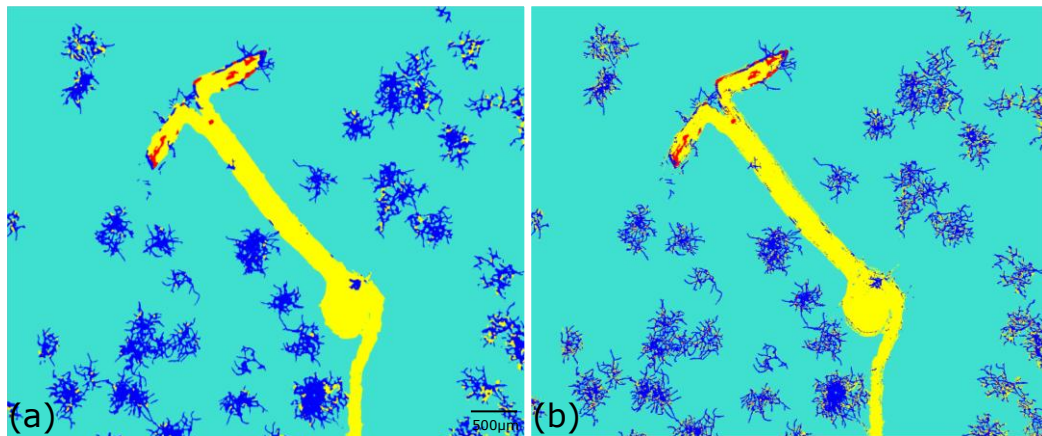


Figure 26 : Segmentation d'une plantule **(a)** avec ou **(b)** sans post-traitement CRF. Les 2 segmentations ont été réalisées avec une BF 33. Légende de segmentation : cyan = arrière-plan, jaune = feuille non nécrosée, rouge = nécrose, bleu = conidies. La photo initiale a été prise selon les condition optimales définies pour l'acquisition des plantules.

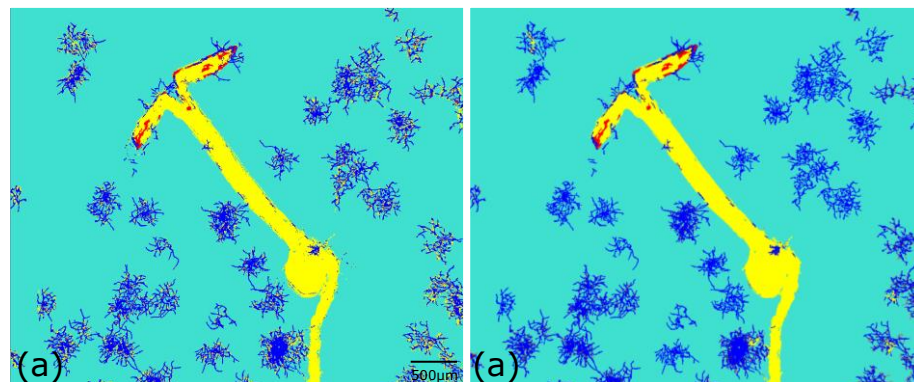


Figure 27 : Segmentation d'une plantule réalisée **(a)** uniquement par le modèle de segmentation, **(b)** par le modèle de segmentation couplé au script d'analyse. Légende de segmentation : cyan = arrière-plan, jaune = feuille non nécrosée, rouge = nécrose, bleu = conidies. La photo initiale a été prise selon les condition optimales définies pour l'acquisition des plantules.

## 4. DISCUSSION

L'objectif de cette étude était de développer un outil local, facile d'accès (par un utilisateur lambda au laboratoire) et permettant de mesurer les symptômes d'infection de la plante par l'agent nécrotrophe *A. brassicicola*. Cet outil a été dimensionné pour faciliter des analyses fonctionnelles de mutants ou l'analyse de l'efficacité de solutions de biocontrôle à l'échelle d'une équipe, comme c'est le cas de l'équipe FUNGISEM à l'IRHS. Cette dernière est actuellement impliquée dans un projet ANR nécessitant de caractériser des mutants déficients pour l'activité de peptides susceptibles de participer à la réponse immunitaire de la plante. Les développements réalisés ont permis de fixer des conditions expérimentales, des méthodes d'acquisition et d'analyse d'images dont les résultats montrent que ce projet est réaliste. Les performances de l'outil, ses limites actuelles ainsi que les améliorations envisageables vont être discutées.

Dans le cas des plantules, une même expérimentation a permis d'optimiser à la fois le plan de semis et les conditions de croissance. Un espacement adapté entre les graines a été déterminé afin de limiter le chevauchement des plantules, ce qui pourrait fausser la mesure des surfaces de conidies. Ce plan, présenté en Figure 21, permet l'analyse de 30 plantules par boîte, assurant l'accès à une puissance statistique suffisante pour un nombre raisonnable de mutants. Dans le cas d'un criblage, une première sélection n'utilisant qu'une seule boîte de semis par génotype est tout à fait envisageable avant de lancer une étude plus approfondie. Il a également été montré que positionner les boîtes de Pétri à la verticale (90°) lors de la culture favorise la croissance des plantules dans le plan de la gélose, facilitant ainsi leur acquisition en imagerie (Barrit et al., 2022). Il est à noter que le nombre de plantules par boîte pourrait encore être augmenté en ajustant la zone de semis (en la remontant légèrement) et en réduisant l'écart entre les lignes. Cela permettrait d'ajouter une ligne supplémentaire, soit 8 plantules de plus.

L'acquisition d'images est réalisée à 10 jours après inoculation (DAI), selon une procédure semi-automatisée. Les coordonnées des plantules sont d'abord définies manuellement à l'aide d'une prévisualisation. Ensuite, une mise au point automatique permet de détecter la hauteur de la surface de la gélose. Chaque plantule est photographiée sur plusieurs plans focaux (Z-stack de 15 images réparties sur 1300 µm) à l'aide d'un objectif 1x pour un GF X16. L'éclairage combiné (réflexion et transmission) assure une bonne luminosité sur les structures biologiques. Cette méthode permet l'obtention d'images nettes avec un temps moyen d'acquisition de 1 minute 20 par plantule, soit environ 40 minutes par boîte, dont 20 minutes sont entièrement automatisées. Ainsi, 5 échantillons de 30 plantules peuvent être imagés en un peu plus de 3 heures, tout en libérant l'utilisateur sur une partie du temps.

En ce qui concerne l'analyse des images, les tests réalisés ont mis en évidence l'importance des filtres intégrés au script, qui améliorent significativement la qualité de la segmentation générée par le modèle. Cependant, le modèle de segmentation développé pour les plantules doit être encore entraîné, car à ce stade, même si les résultats sont convaincants, seulement trois images ont été utilisées pour l'apprentissage. L'annotation précise des conidies et des petites nécroses est une tâche complexe et particulièrement chronophage par rapport au modèle mis en place pour les feuilles de rosette. L'entraînement du modèle devra donc être approfondi afin d'assurer sa robustesse face aux variations biologiques (forme, couleurs, etc.). Une fois cet entraînement finalisé, une comparaison face à une analyse manuelle devra être réalisée pour garantir une vitesse et une qualité d'analyse acceptables. L'utilisation de cet outil pour un usage à débit moyen, tout en restant simple et accessible pour les utilisateurs non spécialistes de l'analyse d'image, reste une



perspective réaliste. Il n'y a aujourd'hui pas de technologie permettant de mesurer objectivement des quantités de conidies autour d'un tissu végétal, ni des surfaces de nécroses à des stades post-germinatifs précoces. Cela est dû à une trop faible résolution des équipements d'imagerie sur les plateformes de phénotypage. Ici, c'est l'infrastructure du plateau d'imagerie cellulaire IMAC qui a été mobilisée pour ce développement. Les logiciels associés aux équipements de microscopie n'avaient, à ce jour, pas été exploités pour réaliser de l'analyse d'images par segmentation, en faisant appel à de l'intelligence artificielle et avec un traitement semi-automatisé. Cette étude permet de valoriser les outils disponibles à IMAC et d'y trouver de nouvelles applications. Caractériser des réponses immunes à un stade précoce au moment de la germination est stratégique pour les analyses fonctionnelles, car Ortega-Cuadros et al. (2024) ont illustré que la graine en germination infectée par *A. brassicicola* illustre des mécanismes d'interactions différents de ceux décrits sur le modèle feuille de rosette. Des approches de génétiques fonctionnelles rendues possibles avec cet outil permettront de mieux comprendre les tenants et les aboutissants de la réponse susceptible de la plantule à *A. brassicicola* si spécifique à ce contexte physiologique (Ortega-Cuadros et al., 2022).

Le développement réalisé pour l'analyse des feuilles de rosette n'a pas permis de caractériser la présence des conidies du champignon. Ainsi, le choix a été fait de prioriser le travail sur l'analyse des nécroses. Un montage expérimental à partir de feuilles inoculées et détachées de la plante a été validé pour réduire l'hétérogénéité des supports de prises. Le fond des supports a également été choisi pour optimiser les contrastes et faciliter l'analyse. Ce dispositif, illustré Figure 11, permet de standardiser la disposition des feuilles et d'optimiser la rapidité d'acquisition. La préparation d'une boîte de 12 feuilles nécessite en moyenne 5 minutes 30.

Les prises de vue sont ensuite réalisées manuellement sur des feuilles à 6 DAI, en utilisant un fond noir, un éclairage annulaire et un objectif 0,5x, pour un grossissement final de X4. La balance des blancs est ajustée à l'aide d'un post-it blanc. Le temps nécessaire à la photographie d'une boîte est d'environ 12 minutes (soit 1 minute par feuille). En configuration binôme, cette manipulation est optimisée : pendant qu'un opérateur prépare une boîte, le second effectue les prises de vue. Ce fonctionnement parallèle permet de photographier approximativement 150 feuilles (30 feuilles pour chacun des cinq génotypes étudiés) en 2 heures 30. Bien qu'aucune référence comparable ne soit disponible dans la littérature, ce délai apparaît raisonnable pour une approche de phénotypage à débit moyen.

Concernant l'analyse des images, les derniers tests indiquent que le modèle de segmentation nécessite un entraînement plus poussé. Les surfaces nécrotiques détectées sont parfois sous-estimées, en particulier pour les nécroses étendues, peu représentées dans les données d'apprentissage. Néanmoins, le temps de traitement est comparable à celui d'une analyse manuelle qui mobilise la concentration de l'utilisateur à 100%. Le modèle a traité 9 images en 7 minutes, soit une estimation de 2 heures pour l'ensemble des 150 images acquises. Ainsi, un phénotypage complet de cinq génotypes peut être réalisé en moins d'une journée, à compter du montage expérimental des images. De plus, l'automatisation de l'analyse constitue un atout majeur : elle ne nécessite aucune intervention pendant le traitement et peut être lancée en parallèle d'autres tâches expérimentales. L'analyse de symptômes nécrotiques sur plante entière a cependant été développée par la plateforme PHENOTIC sur la base de l'analyse d'imagerie par fluorescence. Un éclairage saturant pour la photosynthèse va permettre d'identifier des zones des tissus présentant un défaut de photosynthèse et donc une variation d'émission de fluorescence (Sapoukhina et al., 2022). Seulement, les défauts de photosynthèse ne sont pas exclusivement liés à des symptômes et sont parfois difficiles à interpréter. L'équipe IMORPHEN chargée de ces développements se tourne donc vers l'utilisation



d'imagerie dans le visible (en RGB) moins discriminante, mais évitant de potentiels artéfacts. Cependant, l'utilisation des robots de phénotypages mobilise une grande place et permet de suivre une cinétique d'évolution des symptômes directement en godet au cours du développement de la plante (Tristan Boureau, communication personnelle). Cette approche doit être développée prochainement dans le cadre d'un projet de thèse, mais son usage sera couteux et moins résolutif que l'outil que nous avons commencé à mettre au point.

Plusieurs pistes d'amélioration sont envisagées pour renforcer la robustesse du système. L'utilisation d'un fond bleu uni pourrait faciliter la détection de l'arrière-plan par le modèle, en limitant les erreurs de segmentation, principalement au niveau des feuilles et des nécroses. Une orientation horizontale des feuilles, mieux adaptée à la géométrie du capteur RGB, permettrait également d'éviter les dé-cadrages sur les feuilles de grande taille. Enfin, l'ajout de clichés en fluorescence chlorophyllienne, une approche validée par Pavicic et al. (2021) pourrait améliorer la détection des nécroses si elle est couplée à de l'imagerie RGB (dans le visible), notamment à un stade précoce. Le microscope du plateau IMAC, utilisé dans cette étude, permet d'envisager cette méthode complémentaire.





## 5. CONCLUSION

Au cours de ce stage, un outil de phénotypage quantitatif, semi-automatique, accessible et adapté à un débit moyen a été développé. Il vise à quantifier les symptômes causés par *A. brassicicola* sur deux modèles biologiques d'*Arabidopsis thaliana* : la feuille de rosette et la plantule. Les résultats obtenus sont assez prometteurs puisque l'outil permet la prise et l'analyse d'un grand nombre de photos en un temps raisonnable. Toutefois, les deux modèles de segmentations développés nécessitent un entraînement plus approfondi, notamment à partir d'images présentant une plus grande variabilité biologique (taille nécrose, taille feuille, etc.). Certaines améliorations sont également envisageables, en particulier sur le modèle feuille de rosette. L'utilisation d'un fond bleu pourrait faciliter la détection de l'arrière-plan et améliorer la qualité de la segmentation, tandis que l'acquisition supplémentaire d'images en fluorescence chlorophyllienne permettrait une détection plus précise des nécroses. Une fois finalisé, l'outil devrait permettre le phénotypage rapide d'environ cinq génotypes d'*Arabidopsis thaliana* (hors temps de culture), et pourrait être adapté à d'autres pathosystèmes, sous réserve de développer un protocole d'imagerie, un script d'analyse et un modèle de segmentation approprié. Il pourrait ainsi profiter à d'autres équipes de l'IRHS. Un protocole précis permettant la prise en main de cet outil par n'importe quel utilisateur de passage au laboratoire est en cours de rédaction et sera disponible sur le plateau d'imagerie.

## BIBLIOGRAPHIE

**Aubourg S.** 2021. Characterization of secreted peptides involved in the response to biotic stress in Arabidopsis – STRESS-PEPT. <https://anr.fr/Project-ANR-20-CE20-0025>. Accessed May 2025.

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

**Bataillé-Simoneau N.** 2024. Pathologies fongiques des semences. <https://irhs.angers-nantes.hub.inrae.fr/recherche/pathologies-fongiques-des-semences>. Accessed May 2025.

**Belmas E, Briand M, Kwasiborski A, et al.** 2018. Genome Sequence of the Necrotrophic Plant Pathogen *Alternaria brassicicola* Abra43. *Genome Announcements* **6**.

**Chang S, Xiao F.** 2025. Comprehensive review of plant small signaling peptides: From stress adaptation mechanisms to practical solutions for crop resilience. *International Journal of Biological Macromolecules*, 139971.

**Chawade A, Van Ham J, Blomquist H, Bagge O, Alexandersson E, Ortiz R.** 2019. High-Throughput Field-Phenotyping tools for plant breeding and precision agriculture. *Agronomy* **9**, 258.

**Cho Y.** 2015. How the Necrotrophic Fungus *Alternaria brassicicola* Kills Plant Cells Remains an Enigma. *Eukaryotic Cell* **14**, 335–344.

**Dhondt S, Wuyts N, Inzé D.** 2013. Cell to whole-plant phenotyping: the best is yet to come. *Trends in Plant Science* **18**, 428–439.

**Filipski A, Kumar S.** 2005. Comparative genomics in eukaryotes. Elsevier eBooks. 521–583.

**Gill T, Gill SK, Saini DK, Chopra Y, De Koff JP, Sandhu KS.** 2022. A comprehensive review of high throughput phenotyping and machine learning for plant stress phenotyping. *Phenomics* **2**, 156–183.

**IRHS.** a. UMR 1345 Institut de recherche en Horticulture et Semences (IRHS). <https://irhs.angers-nantes.hub.inrae.fr/content/download/7566/91662>. Accessed May 2025.

**IRHS.** b. L'IRHS: Qui sommes-nous? <https://irhs.angers-nantes.hub.inrae.fr/>. Accessed May 2025.

**Ji C, Li H, Zhang Z, Peng S, Liu J, Zhou Y, Yang Y, Han H.** 2025. The power of small signaling peptides in crop and horticultural plants. *The Crop Journal* doi: 10.1016/j.cj.2024.12.020.

**Keerthana K, Ramakrishnan M, Ahmad Z, Amali P, Vijayakanth V, Wei Q.** 2025. Root-derived small peptides: Key regulators of plant development, stress resilience, and nutrient acquisition. *Plant Science*, 112433.

**Köhl J, Van Tongeren C a. M, Haas BHG, Van Hoof RA, Driessen R, Van Der Heijden L.** 2009. Epidemiology of dark leaf spot caused by *Alternaria brassicicola* and *A. brassicae* in organic seed production of cauliflower. *Plant Pathology* **59**, 358–367.

**Lin Y.** 2015. LiDAR: An important tool for next-generation phenotyping technology of high potential for plant phenomics? *Computers and Electronics in Agriculture* **119**, 61–73.

**Muller A, Schader C, Scialabba NE-H, et al.** 2017. Strategies for feeding the world more sustainably with organic agriculture. *Nature Communications* **8**.

**Mutka AM, Bart RS.** 2015. Image-based phenotyping of plant disease symptoms. *Frontiers in Plant Science* **5**.

**National Academies of Sciences, Engineering, and Medicine.** 2019. Science breakthroughs to advance food and agricultural research by 2030. Washington, DC: The National Academies Press doi: 10.17226/25059.

**Ortega-Cuadros M, Aligon S, Arias T, Vasco-Palacios AM, Rosier--Pennevert C, Guschinskaya N, Rolland A, Grappin P.** 2024. Fungal necrotrophic interaction: a case study of seed immune response to a Seed-Borne pathogen. *Seeds* **3**, 216–227.

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

**Pavicic M, Overmyer K, Rehman AU, Jones P, Jacobson D, Himanen K.** 2021. Image-Based methods to score fungal pathogen symptom progression and severity in excised arabidopsis leaves. *Plants* **10**, 158.

**Pieruschka R, Schurr U.** 2019. Plant phenotyping: past, present, and future. *Plant Phenomics* **2019**.

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

**Rolland A.** 2025. IMAC (Imagerie Cellulaire). <https://www.sfrquasavangers.org/plateaux-techniques/imac-imagerie-cellulaire>. Accessed May 2025.

**Rouvier C.** 2024. Rôle des peptides dans la résistance des semences à un agent pathogène transmis par les semences: *Alternaria brassicicola*. mémoire de fin d'études, Institut Agro Rennes-Angers.

**Sapoukhina N, Boureau T, Rousseau D.** 2022. Plant disease symptom segmentation in chlorophyll fluorescence imaging with a synthetic dataset. *Frontiers in Plant Science* **13**.

**Shi C-L.** 2020. Small peptides raising in plants. *Molecular Plant* **13**, 1101.

**Takahashi F, Hanada K, Kondo T, Shinozaki K.** 2019. Hormone-like peptides and small coding genes in plant stress signaling and development. *Current Opinion in Plant Biology* **51**, 88–95.

**Tanner F, Tonn S, De Wit J, Van Den Ackerveken G, Berger B, Plett D.** 2022. Sensor-based phenotyping of above-ground plant-pathogen interactions. *Plant Methods* **18**.

**Wahab A, Batool F, Abdi G, Muhammad M, Ullah S, Zaman W.** 2025. Role of Plant Growth-Promoting Rhizobacteria in Sustainable agriculture: Addressing environmental and Biological challenges. *Journal of Plant Physiology* **307**, 154455.

**Yadav A, Yadav K, Ahmad R, Abd-Elsalam K.** 2023. Emerging frontiers in nanotechnology for precision agriculture: Advancements, hurdles and prospects. *Agrochemicals* **2**, 220–256.

**ZEISS.** a. Deep learning for automated image analysis. <https://www.zeiss.com/metrology/en/software/zeiss-zen-core/deep-learning-for-complex-image-processing.html>. Accessed June 2025.

## RESUME

### **Développement d'un outil de phénotypage pour étudier la sensibilité d'*Arabidopsis thaliana* à *Alternaria brassicicola***

Ce rapport détaille le développement d'un outil de phénotypage quantitatif et semi-automatique visant à caractériser la sensibilité de mutants d'*Arabidopsis thaliana* aux symptômes causés par le champignon phytopathogène *Alternaria brassicicola*. En réponse aux enjeux de l'agriculture moderne et aux limites des méthodes d'évaluation visuelle, l'objectif était de créer une solution accessible et à débit moyen pour l'étude du pathosystème sur feuilles de rosette et sur jeunes plantules. L'outil s'appuie sur l'utilisation d'un microscope ZEISS et de son logiciel associé, ZEN, intégrant un module de machine learning pour la segmentation d'images. Un montage expérimental et un plan de semis ont été conçus pour optimiser la prise d'images. Des protocoles d'acquisition adaptés à chaque modèle, incluant l'éclairage, l'optique et le mode de capture, ont également été établis. Deux modèles intelligents de segmentation par classification de pixels ont été développés et entraînés pour identifier les nécroses sur feuilles et les nécroses/conidies sur plantules. Les résultats démontrent la capacité de ce nouvel outil à traiter un grand nombre d'images en un temps raisonnable (environ 1 min par feuille ou plantule pour l'acquisition). Cependant, les modèles de segmentation nécessitent un entraînement plus approfondi avec une diversité d'images accrue afin d'améliorer leur robustesse et leur fiabilité. Une fois finalisé, cet outil permettra un phénotypage rapide et objectif des mutants pour des approches d'analyse fonctionnelle.

**Mots-clés : Phénotypage, Machine learning, segmentation par classification de pixel, *Arabidopsis thaliana*, *Alternaria brassicicola***

## ABSTRACT

### **Development of a phenotyping tool to study the sensitivity of *Arabidopsis thaliana* to *Alternaria brassicicola***

This report details the development of a quantitative and semi-automated phenotyping tool to characterize the susceptibility of *Arabidopsis thaliana* mutants to symptoms caused by the phytopathogenic fungus *Alternaria brassicicola*. In response to the challenges of modern agriculture and the limitations of visual assessment methods, the objective was to create an accessible and medium-throughput solution for the study of the pathosystem on rosette leaves and young seedlings. The tool is based on a ZEISS microscope and the related ZEN software, integrating a machine learning module for image segmentation. An experimental setup and a sowing plan were designed to optimize image capture. Acquisition protocols adapted to each model, including lighting, optics, and capture mode, were also established. Two intelligent pixel classification segmentation models were developed and trained to identify necrosis on leaves and necrosis/conidia on seedlings. The results demonstrate the tool's ability to process numerous images in a reasonable time (approximately 1 min per leaf or seedling for acquisition). However, the segmentation models require further training with increased image diversity to improve their robustness and reliability. Once finalized, this tool will enable rapid and objective phenotyping approaches for mutant analyses and functional approaches.

**Key words : Phenotyping, Machine learning, segmentation by pixel classification, *Arabidopsis thaliana*, *Alternaria brassicicola***