



HAL
open science

Etude du rôle de la modulation des voies de signalisation hormonales dans les interactions arbre-microbiote par l'intermédiaire de lignées transgéniques de peuplier

Félix Fracchia

► To cite this version:

Félix Fracchia. Etude du rôle de la modulation des voies de signalisation hormonales dans les interactions arbre-microbiote par l'intermédiaire de lignées transgéniques de peuplier. Mycologie. 2018. hal-03794339

HAL Id: hal-03794339

<https://hal.inrae.fr/hal-03794339>

Submitted on 3 Oct 2022

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.



Master FAGE : 2017-2018

Biologie et Ecologie pour la Forêt, l'Agronomie et l'Environnement

Spécialité :

Biologie Intégrative de l'Arbre et des Plantes Cultivées

Etude du rôle de la modulation des voies de
signalisation hormonales dans les interactions arbre-
microbiote par l'intermédiaire de lignées
transgéniques de peupliers.

Félix FRACCHIA

05 février – 31 Juillet 2018

Encadré par :

Claire Veneault-Fourrey (Maître de Conférences)
Aurélie Deveau (Chargée de Recherche)

Centre INRA Grand Est-Nancy

UMR1136 INRA-Université de Lorraine : Interactions Arbres-Microorganismes

Remerciements :

Je tiens tout d'abord à remercier particulièrement Claire Veneault-Fourrey et Aurélie Deveau pour m'avoir permis de réaliser ce stage et toutes les opportunités offertes dans le monde extraordinaire des interactions arbres-microorganismes. Merci pour vos conseils, votre écoute, votre sens de l'humour, mais plus particulièrement, merci de m'avoir laissé développer une petite forêt de peupliers transgéniques, et découvrir le monde incroyablement artistique des champignons symbiotiques.

Je remercie également Lauralie Mangeot-Peltier, pour sa bonne humeur, son enthousiasme, son aide et ses hypothèses dans le développement de ce projet. Merci à Véronica Basso, grande pédagogue, pour sa passion scientifique, sa patience, nos randonnées Vosgiennes sous la neige ou le soleil, et dont chaque plante transgénique remercie le sort de l'avoir déposé entre ses mains expertes.

Un grand merci à tout le personnel de l'INRA-IAM, Christine, Patrice, Frédéric, Cyrille, Flora, Laure, Annegret, Claude, Emmanuelle, Luca, Stéphane, Marc, Sébastien et Francis. Merci aux doctorants, post-doctorants et stagiaires, Clémence, Milena, François, Feng, Hang, Alexandra, Lin, Liam, Chloé, pour leur disponibilité, leur partage, et qui donnent au laboratoire une atmosphère unique, pleine de bonne humeur et de sagesse.

Merci à tous pour cette mémorable expérience, sans oublier les discussions aux pauses café de 10h30, entourés de gâteaux au chocolat-concombres, de brochettes de poissons, et bien sûr, aux prochaines dégustations de mirabelles.

Liste des Abréviations :

AND : Acide Désoxyribonucléique
ADNc : ADN Complémentaires
ADNr : ADN ribosomique
AG : Acide Gibbérellique
AJ : Acide Jasmonique
AM : Champignons Endomycorhiziens à Arbuscules
ARN : Acide Désoxyribonucléique
ARNi : Interférence à Acide Désoxyribonucléique
AS : Acide Salicylique
bp : paire de bases
°C : Degré Celcius
DES : Dark Septate Endophyte
DsRed : Discosoma sp. Red Fluorescent Protein
ECM : Champignons Ectomycorhiziens
ET : Ethylène
ITS : Internal Transcribed Spacer
kb : kilo base
mRFP : Monomeric Red Fluorescent Protein
MS : Murashige and Skoog
nt : nucleotide
PBS : Phosphate-buffered saline
PCR : Polymérase Chain Reaction
PFA : Paraformaldéhyde
Tm : Temperature melting

Sommaire :

I. Introduction :	1
II. Matériels et Méthodes :	4
1. Création de lignées transgéniques de peuplier affectées dans les voies de signalisation de l'acide salicylique, acide gibbérellique et la production de terpènes :	4
(a) Matériel végétal :	4
(b) Clonage pour la surexpression et interférence à ARN :	4
(c) Transgénèse :.....	6
2. Acclimatation de vitroplants de peuplier en sol naturel pour étudier la cinétique de colonisation de leur système racinaire par les microorganismes :	7
(a) Sol :	7
(b) Dispositif de culture et échantillonnage :	7
(c) Marquage et Microscopie :.....	7
(d) Extraction d'ADN et construction des banques d'amplicons pour séquençage haut débit	8
III. Résultats :	8
1. Clonage de gènes de peuplier pour leur surexpression ou extinction par interférence à ARN :	8
(a) Amplifications PCR pour la surexpression et interférence à ARN :	8
(b) Recombinaison BP :	9
(c) Recombinaison LR :	10
(d) Transformation d' <i>Agrobacterium rhizogenes</i> :	11
2. Transformation de peupliers et expression des transgènes :	12
3. Cinétique de colonisation racinaire par les microorganismes du sol :	13
(a) Observations par microscopie optique et confocale :	13
(b) Extraction ADN et Metabarcoding :	15
IV. Discussion :	15
V. Conclusion :	19
Bibliographie :	19

Table des Figures :

Figures :

Figure 1 : Interactions et compartimentation du microbiome racinaire :	1
Figure 2 : Amplification PCR des ADNc pour obtenir les constructions pleines longueurs et ARNi :	5
Figure 3 : Evénements de recombinaison BP :	5
Figure 4 : Evénements de recombinaison LR :	6
Figure 5 : Migration sur gel d'agarose à 1% des produits d'amplification PCR permettant de générer les constructions attB pour les lignées de surexpression :	8
Figure 6 : Arbre phylogénétique des gènes NPR1 et NPR1-like construit selon la méthode Neighbor-Joining :	9
Figure 7 : Migration sur gel d'agarose à 1% des produits d'amplification PCR permettant de générer les constructions attB pour les lignées de répression RNAi :	9
Figure 8 : Migration sur gel d'agarose à 1% des produits d'amplification pleines longueurs de la PCR sur colonies bactériennes isolées sur milieu sélectif avec les amorces M13_F-M13_R :	10
Figure 9 : Migration sur gel d'agarose à 1% des produits d'amplification ARNi de la PCR sur colonies bactériennes isolées sur milieu sélectif avec les amorces M13_F-M13_R:	10
Figure 10 : Migration sur gel d'agarose à 1% des produits d'amplification pleines longueurs de la PCR sur colonies bactériennes isolées sur milieu sélectif avec les amorces VB006-VB007 :	10
Figure 11 : Migration sur gel d'agarose à 1% des produits d'amplification ARNi de la PCR sur colonies bactériennes isolées sur milieu sélectif avec les amorces CmR_R-VB006 :	11
Figure 12 : Chromatogramme du séquençage de la construction PtDELLA.G1107i contenu dans le plasmide d'expression :	11
Figure 13 : Migration sur gel d'agarose à 1% des produits d'amplification pleines longueurs de la PCR sur colonies bactériennes isolées sur milieu sélectif avec les amorces VB006-VB007 :	11
Figure 14 : Migration sur gel d'agarose à 1% des produits d'amplification ARNi de la PCR sur colonies bactériennes isolées sur milieu sélectif avec les amorces CmR_R-VB006 :	12
Figure 15 : Régénération du système racinaire d'un peuplier transgénique dans les voies de signalisation de l'AS :	12
Figure 16 : Régénération de la partie apicale d'un peuplier transgénique dans les voies de signalisation de l'AS :	12
Figure 17 : Dynamique de la colonisation racinaire à T0 et T4 :	13
Figure 18 : Dynamique de la colonisation racinaire à T7 et T21 :	14
Figure 19 : Dynamique de la colonisation racinaire à T30 et formation d'une ECM :	15
Figure 20 : Amplification PCR des régions 16S et ITS :	15

Annexe I : Milieux de Culture

Tableau 1 : Composition du milieu de culture Murashige and Skoog :

Tableau 2 : Composition du milieu de culture Yoshida :

Tableau 3 : Composition du milieu de culture Yoshida co-culture :

Tableau 4 : Composition du milieu de culture Yoshida antibiotique :

Tableau 5 : Composition du milieu de culture Yoshida sélection :

Tableau 6 : Composition du milieu de culture Yoshida sélection +TDZ :

Annexe II : Gènes Candidats et Programmes PCR

Tableau 1 : Liste des gènes candidats impliqués dans les voies de production et de signalisation hormonales :

Tableau 2 : Listes des amorces attB et des programmes PCR correspondant aux amplifications PCR permettant la création des constructions attB :

Tableau 3 : Listes des amorces et des programmes PCR correspondant aux amplifications PCR réalisées sur colonies bactériennes après recombinaison BP :

Tableau 4 : Listes des amorces et des programmes PCR correspondant aux amplifications PCR réalisées sur colonies bactériennes après recombinaison LR sur les lignées de surexpression. :

Tableau 5 : Listes des amorces et des programmes PCR correspondant aux amplifications PCR réalisées sur colonies bactériennes après recombinaison LR sur les lignées d'interférence à ARN :

Tableau 6 : Bilan des lignées transgéniques générées :

Annexe III : Cartes Génétiques des Plasmides Donneurs et Destinataires

Figure 1 : Plasmide d'entrée pDONR 222 permettant la recombinaison BP chez les lignées de surexpression et d'interférence ARN :

Figure 2 : Plasmide destinataire pJCV53 permettant la recombinaison LR chez les lignées transgéniques de surexpression :

Figure 3 : Plasmide destinataire pK7GWIWG2 II (RedRoot) permettant la recombinaison LR chez les lignées transgéniques de répression:

Résumé :

Les plantes interagissent avec une très large variété de microorganismes fongiques et bactériens présents dans leur microbiome, enrichissant leur potentiel développemental et immun. L'éthylène (ET), l'acide jasmonique (AJ), l'acide gibbérélique (AG), et l'acide salicylique (AS) sont les quatre hormones majeures impliquées dans l'équilibre croissance / immunité et sont induites lors d'attaques par des microorganismes pathogènes ou des parasites. Leurs rôles respectifs dans le contrôle du microbiome commensal chez les arbres sont méconnus. Nous avons créé chez le peuplier, des lignées transgéniques de surexpression et de répression dans les voies de production et de signalisation de l'AS, l'AG, et de l'ET afin de déterminer le rôle de ces hormones dans les interactions entre le peuplier et son microbiote. En parallèle, nous avons analysé par microscopie optique, confocale et séquençage haut débit de marqueurs taxonomiques fongiques (ITS) et bactériens (16S), la cinétique de colonisation du système racinaire de clones de peupliers sauvage pendant 50 jours, afin de comparer ultérieurement les changements des communautés bactériennes et fongiques endo-rhizosphériques chez les lignées transgéniques générées. Nous avons observé une transition dans l'établissement des communautés fongiques, avec le remplacement progressif des champignons endomycorhiziens à arbuscules (AM) par les champignons ectomycorhiziens (ECM). L'utilisation complémentaire de séquençage haut débit des empreintes génétiques bactériennes et fongiques, nous permettra d'inférer ces observations et de déterminer le rôle des modulations hormonales dans l'établissement du rhizobiome.

Mots Clefs :

Clonage, Expression transgénique, Microscopie Confocale, Phytohormones, Peuplier, Rhizobiome

Abstract :

Plants interact with a great variety of fungi and bacterial communities living within their roots, stimulating their development and immune system. Although their role are still poorly understood in the root microbiome establishment, ethylen (ET), jasmonic acid (JA), gibberellic acid (GA), and salicylic acid (SA) are four major plant hormones involved in the growth-immunity balance, and are all induced during pathogen attacks. To investigate their role in the poplar-rhizobiome interactions, we created transgenic poplar overexpressing or silencing genes in the production or signalization pathway of AS, AG, and ET. We also analysed the root colonization dynamic over 50 days, using optic and confocal microscopy in parallel to fungal taxonomic (ITS) and bacterial (16S) markers sequencing, to later determine the changing of these roots communities in the newly developed transgenic lines. We observed a succession in the establishment of fungal communities in wild type poplar, with the replacement of arbuscular mycorrhizal fungi (AM) by ectomycorrhizal fungi (ECM). The future coming high throughout sequencing results should confirm these observations and bring new understating of plant hormonal modulation in the root microbiome establishment.

Key Words :

Cloning, Confocal Microscopy, Phytohormones, Poplar, Transgenic Expression, Rhizobiome

I. Introduction :

Tous les organismes eucaryotes entretiennent des relations complexes avec des communautés de microorganismes, présentes dans leur environnement, constituant le microbiome. Largement mises en avant ces dernières années, de nombreuses études ont démontré les capacités du microbiote intestinal animal à modifier, via des interactions bénéfiques ou délétères, le système immunitaire, la nutrition et donc plus globalement la santé de leur hôte (Hacquard *et al.*, 2017). A l'instar du système digestif animal, le système racinaire est un organe essentiel dans la nutrition de la plante. Similaire à un tube digestif inversé, les racines s'associent également avec une myriade de microorganismes, que nous définissons ici comme le rhizobiome (Hacquard *et al.*, 2015), où bactéries et champignons sont les principaux ingrédients de ce cocktail (Philippot *et al.*, 2013). Le résultat de ces associations entre le microbiome et son hôte sont variables dans le temps et dans l'espace, et se répartissent sur une large gamme d'interactions, qui oscillent entre parasitisme (plante-pathogènes du sol) et mutualisme (symbioses) (Lareen *et al.*, 2016).

Il est aujourd'hui admis que la coévolution entre la plante et son microbiome est à l'origine de la colonisation terrestre des plantes, et ce, dès le milieu de l'Ordovicien il y a 470 million d'années (Wang *et al.*, 2010; Strullu-Derrien *et al.*, 2014). En effet, associés aussi bien à la colonisation interne (endosphère), qu'externe de la racine (rhizosphère), certains microorganismes et notamment les PGPM (Plant Growth Promoting Microbes) favorisent le développement, la croissance et la protection de la plante contre des stress biotiques et abiotiques (Figure 1). A titre d'exemple, les champignons endomycorhiziens à arbuscules (AM) et ectomycorhiziens (ECM), jouent le rôle d'extension du système racinaire, fournissant la plante en éléments nutritifs (phosphate, azote, ...) lorsque ceux-ci sont peu disponibles dans les sols (Selosse & Roy, 2009). En échange de ces nutriments, la plante hôte transfère à ses microorganismes associés du carbone photo-assimilé sous forme de sucres (Kiers *et al.*, 2011; van der Heijden *et al.*, 2015).

Nonobstant, ces interactions ne sont pas restreintes aux seuls champignons et parmi les millions de bactéries présentes dans la rhizosphère, certaines PGPR (Plant Growth Promoting Rhizobacteria), favorisent aussi le développement des plantes. Ainsi, certaines bactéries, notamment les associations *Rhizobium*-légumineuses sont des modèles symbiotiques, notamment via la fixation et le métabolisme de l'azote atmosphérique (Bakker *et al.*, 2018). D'autres genres bactériens, dont les *Pseudomonas*, permettent l'acquisition de sels minéraux ou encore la synthèse de molécules aux propriétés anti-microbiennes (Bulgarelli *et al.*, 2013).

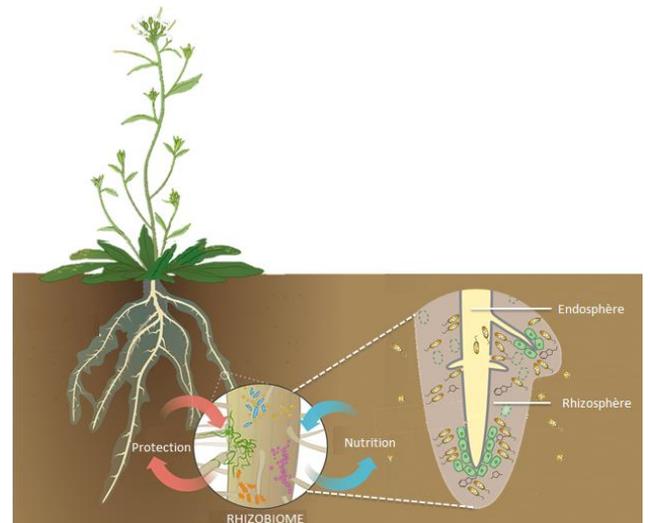


Figure 1 : Interactions et compartimentation du rhizobiome. La perception de stress biotiques et abiotiques entraîne la sélection au sein du microbiome racinaire des microorganismes les plus bénéfiques pour la plante. Ce microbiome, présent aussi bien dans la rhizosphère (zone du sol sous l'influence directe des racines), que dans l'endosphère, peut favoriser la santé de la plante via l'optimisation de sa nutrition ou la protection contre des organismes pathogènes. Adapté de Bakker et al. (2018).

Pour bénéficier de ces interactions mutualistes, les plantes sécrètent des molécules cibles, notamment les strigolactones (López-Ráez *et al.*, 2011), qui une fois perçues par les microorganismes, encouragent leur association avec la plante hôte.

Loin d'être une exclusivité végétale, l'établissement et le maintien de ces interactions

repose sur un dialogue moléculaire bidirectionnel entre la plante hôte et les microorganismes associés (Martin *et al.*, 2017). Les PGPM et plus particulièrement les champignons mycorrhiziens influencent l'architecture racinaire et le développement d'organes mixtes, tels que les ectomycorhizes, via la sécrétion de molécules signales et d'hormones. La perception de ces signaux stimule la ramification des racines latérales chez l'épicéa (Krause *et al.*, 2015) et le peuplier (Felten *et al.*, 2009; Ditengou *et al.*, 2015), ainsi que l'établissement des ECM. L'environnement rhizosphérique est donc le siège d'interactions pluridirectionnelles entre la plante et les différents protagonistes associés.

La mise en place de ces relations mutualistes mène inexorablement à une réorganisation de la composition des communautés de microorganismes endorhizosphériques. Ces interactions réciproques où les plantes bénéficient de leur microbiome suggèrent l'existence d'une sélection des plantes sur les microorganismes les plus avantageux (Kiers *et al.*, 2011). Au moins trois études (Shakya *et al.*, 2013; Uroz *et al.*, 2016; Beckers *et al.*, 2017) ont démontré l'enrichissement spécifique de certains genres bactériens dans le rhizobiome par rapport au sol naturel. Différents paramètres, abiotiques comme les propriétés physico-chimiques du sol (pH, structure, disponibilité des nutriments, ...) (Gottel *et al.*, 2011), mais aussi biotiques à l'exemple du génotype de la plante hôte, impliqués dans la configuration des communautés rhizosphériques (Bulgarelli *et al.*, 2013; Schlaeppli & Bulgarelli, 2015). Les phytohormones et la rhizodéposition (phénomène comprenant la production de cellules de la coiffe racinaire, la sécrétion de mucilage, ainsi que la diffusion d'exsudats racinaires), sont toutes deux dépendantes du génotype de la plante (Nguyen, 2009; Puga-Freitas & Blouin, 2015). Ces rhizodépôts sont une source non négligeable de nutriments pour les microorganismes et peuvent représenter jusqu'à 30% du carbone photo-assimilé (Nguyen, 2009; Badri & Vivanco, 2009; Huang *et al.*, 2014). Ces multiples interactions conduisent à la dynamique d'enrichissement de certaines espèces plus ou moins spécifiques de

l'environnement racinaire. La rhizosphère est donc un carrefour d'interactions multidirectionnelles où les différents protagonistes : le sol, la plante et les microorganismes, participent à la structuration du rhizobiome.

Toutefois, les plantes sont capables de détecter les microorganismes pathogènes et symbiotiques. Elles possèdent des récepteurs membranaires nommés Pathogen Recognition Receptor (PRR) capables de détecter leur présence grâce à la reconnaissance de motifs moléculaires spécifiquement associés aux microorganismes microbiens (MAMPs) (Jones & Dangl, 2006; Robert-Seilaniantz *et al.*, 2011). Cette perception conduit à l'induction du premier niveau de défense du système immunitaire nommée MAMP-triggered immunity (MTI). L'induction de la MTI déclenche les réponses de défense médiées par quatre phytohormones majeures. L'acide jasmonique (AJ), l'éthylène (ET), l'acide salicylique (AS), et l'acide gibbéréllique (AG) sont les principales hormones impliquées dans les stress biotiques. Elles ont un rôle de pivot dans les régulations entre croissance et défense et sont donc à l'interface de la configuration du rhizobiome (Jones & Dangl, 2006; Badri & Vivanco, 2009).

Afin de contourner les défenses déclenchées par le système immunitaire, les microorganismes pathogènes ou symbiotiques sécrètent des effecteurs. A titre d'exemple, lors de l'association entre les racines de peuplier et le champignon ectomycorhizien *Laccaria bicolor*, ce dernier sécrète une protéine MiSSP7 qui interagit avec le PtJAZ6, un co-récepteur de l'acide jasmonique. Cette interaction directe inhibe la voie de signalisation de l'acide jasmonique, inhibition requise pour la colonisation in planta du champignon ectomycorhizien (Plett *et al.*, 2011, 2014a). Les auteurs ont proposé que cette inhibition de la voie de signalisation JA inhiberait la réponse immunitaire et favoriserait la mise en place de l'association symbiotique entre *L. bicolor* et le peuplier. On retrouve un stratagème similaire chez le champignon endomycorhizien *Rhizophagus irregularis*. Le champignon sécrète

une protéine SP7 qui se couple au facteur de transcription ERF19 chez *Medicago truncatula* et inhibe l'induction de la voie de signalisation de l'éthylène (Kloppholz *et al.*, 2011). De plus, (Heck *et al.*, 2016) ont démontré que *R. irregularis* sécrète des molécules signales qui stimulent la voie de signalisation de l'AG, via l'activation du facteur de transcription MIG1 (appartenant à la famille de facteur transcription comprenant un domaine GRAS) chez *Medicago truncatula*. MIG1 agit de concert avec les protéines DELLA, pour conduire au développement de l'arbuscule via la réorganisation des cellules du cortex racinaire. Le contrôle des régulations hormonales, aussi bien par l'hôte que par ses microorganismes fongiques associés, représente la clef de voûte dans l'édification du rhizobiome.

(Plett *et al.*, 2014b) ont observé des perturbations de la mycorhization entre *L. bicolor* et des peupliers transgéniques affectés soit dans la biosynthèse, soit dans la signalisation de l'éthylène. De plus, au moins trois études (Carvalhais *et al.*, 2013, 2015; Lebeis *et al.*, 2015), ont étudié les effets des modifications de ces voies hormonales sur les variations des communautés bactériennes rhizosphériques. (Lebeis *et al.*, 2015) ont démontré que la composition du microbiome racinaire de lignées transgéniques d'*A. thaliana* défectueuses ou surexprimant des gènes des voies de signalisation de l'AS, l'AJ et l'ET, différait des souches sauvages. Toujours chez *A. thaliana*, la répression des voies de signalisation de l'AJ induit des modifications aussi bien dans les communautés bactériennes rhizobiennes, que des profils d'exsudats racinaires (Carvalhais *et al.*, 2015). Ces résultats suggèrent l'importance quantitative et qualitative des exsudats racinaires et des phytohormones dans l'établissement et la configuration du rhizobiome bactérien.

Toutefois, ces précédentes études se sont intéressées à l'évolution du rhizobiome bactérien lors de modification du système immunitaire chez *A. thaliana*, espèce végétale ni pérenne, ni ligneuse, ni mycorhizienne (Carvalhais *et al.*, 2013, 2015; Lebeis *et al.*, 2015). Il est donc

difficile d'extrapoler ces résultats aux arbres. D'autre part, (Plett *et al.*, 2014b) travaillaient sur des interactions bidirectionnelles : peuplier-*Laccaria*, sans observation du microbiome racinaire dans son ensemble. Le peuplier est une espèce majeure de la filière sylvicole française. Arbre à croissance rapide, il représente 25% de la récolte annuelle en feuillus mais seulement 1,4% de la surface forestière, et les industries françaises devraient connaître une rupture de leur approvisionnement à partir du début 2020 (source CODIFAB). En plus d'être une espèce modèle en biologie végétale, il a la particularité de s'associer aussi bien à des champignons endophytiques qu'à des champignons AM et ECM. Comprendre les mécanismes moléculaires du système immunitaire impliqués dans les interactions entre une plante ligneuse mycorhizienne et les microorganismes associés au système racinaire est donc d'un intérêt particulier.

En conclusion, le contrôle des régulations hormonales jouent un rôle déterminant dans les interactions entre la racine et les microorganismes associés (Bakker *et al.*, 2018), et particulièrement dans le cas d'espèces mycorhiziennes. Nous avons émis les hypothèses que des modifications dans les voies de régulation hormonales (GA, SA, ET) entraîneraient (i) une altération spatio-temporelle de la mycorhization (ii) une évolution de la structure des communautés microbiennes (iii) et de la composition du rhizobiome ? Afin de répondre à ces questions, nous avons créé deux types de lignées transgéniques, surexprimeurs et sous-exprimeurs, à partir de l'organisme modèle *Populus tremula x alba* INRA clone 717-1B4. Le premier type de lignée surexprime des gènes impliqués dans les voies de biosynthèses de l'AG et des terpènes, les voies de signalisation de l'AG, et de l'AS, tandis que le second type réduit l'expression de ces mêmes gènes par extinction de gènes via interférence ARN. Ces lignées seront ensuite testées pour leur capacité à former des mycorhizes et à interagir avec le microbiome dans un contexte naturel. Une étape préalable indispensable à ces études est d'établir la dynamique d'interaction entre les racines de peuplier et son microbiome. Chez la souche sauvage de peuplier, nous avons observé sur 50

jours l'évolution spatio-temporelle de la colonisation du système racinaire par des champignons endo-rhizosphériques par microscopie confocale. Ces résultats seront confirmés, et l'architecture des communautés microbiennes analysée par une approche de séquençage haut débit de marqueurs taxonomiques fongiques (ITS) et bactériens (16S). L'ET, l'AS et l'AG étant des hormones majeures impliquées dans les balances croissance / défenses immunitaires et les colonisations microbiennes, l'identification des communautés rhizobiennes associés à des lignées transgéniques dans ces voies de signalisation, permettra d'approfondir la compréhension des interactions hormones-microorganismes dans l'établissement du rhizobiome chez le peuplier.

II. Matériels et Méthodes :

1) Création de lignées transgéniques de peuplier affectées dans les voies de signalisation de l'acide salicylique, acide gibbéréllique et la production de terpènes :

a. Matériel végétal :

Pour le développement des lignées transgéniques, nous avons utilisé des boutures de peupliers *Populus tremula x alba* INRA clone 717-1B4 maintenues *in vitro* et cultivées pendant 6 semaines sur milieu Murashige and Skoog (MS) (voir Annexe I pour la composition des milieux), dans des tubes à essai à 24°C avec une photopériode de 16h et une intensité lumineuse de 150 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$.

b. Clonage pour la surexpression et interférence à ARN :

Dans le but de créer des constructions de surexpression ou au contraire de répression d'un gène d'intérêt, nous avons utilisé la méthode GATEWAY (Invitrogen). En résumé, cette méthode consiste à insérer une construction PCR contenant un gène d'intérêt, ou un fragment de ce gène (Figure 2), par recombinaison (BP-

recombinaison) dans un "plasmide d'entrée", remplaçant le gène *ccdB* présent sur ce plasmide (Figure 3). La séquence d'intérêt sera par la suite recombinée (LR-recombinaison) à la place d'un nouveau gène *ccdB*, dans un "plasmide destinataire", conduisant à la création d'un "plasmide d'expression" contenant la construction d'intérêt qui sera exprimé dans un organisme cible après transformation (Figure 4). Les gènes *ccdB* codent pour une toxine naturel et permettent de sélectionner les bactéries contenant le plasmide recombiné qui ne porte plus ce gène, car létal lorsqu'il est exprimé.

Dans une première étape, nous avons synthétisé des ADN complémentaires (ADNc) à partir de 5 μg d'ARN extraits de racines de peupliers en utilisant le kit First Strand cDNA Synthesis®, suivant les instructions du fournisseur (QIAGEN). Ces peupliers avaient subis une combinaison de traitements exogènes hormonaux (SA, JA, GA), et étaient mycorhizés ou non par *L. bicolor*.

Les ADNc pleine longueur (sur expression) et des fragments variant de 331 à 388 bp (ARN interférence) de 11 gènes candidats impliqués dans les voies de signalisation hormonales GA, SA, et de l'ET (Annexe II, Tableau 1), ont été amplifiés par PCR (Figure 2). Nous avons utilisé les amorces décrites dans le Tableau 2 (Annexe II) et dessinées à partir du génome *Populus trichocarpa 3.0* (<https://phytozome.jgi.doe.gov>, (Tuskan *et al.*, 2006). Les amorces permettant le clonage GATEWAY sont construites en trois parties. Les deux premières, constituées de 4 guanines et des sites attB1 et attB2 sont constantes, tandis que la troisième correspond à 25 nucléotides spécifiques de la séquence du gène d'intérêt. Pour nos lignées d'interférence à ARN, nous avons amplifié environ 300 nucléotides du gène d'intérêt. Nous avons créé des amorces s'hybridant au moins 100 nucléotides en aval du codon « Start » et 100 nt en amont du codon « Stop » tout en prêtant une attention particulière au phénomène d'hybridation non spécifique et en gardant une température d'hybridation comprise entre 50 et 60 °C. Après amplification PCR, nous avons vérifié la taille de nos constructions par électrophorèse sur gel d'agarose à 1%. Nous avons purifié les produits PCR après

électrophorèse sur gel d'agarose à 1% avec le kit QIAquick Gel Extraction® (QIAGEN) suivant les instructions du fournisseur.

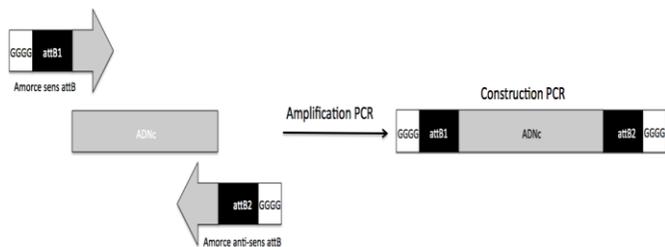


Figure 2 : Amplification PCR des ADNc pour obtenir les constructions pleines longueurs et ARNi. Amplification PCR avec les amorces attB constituées de 3 parties : 4 guanines, sites attB1 ou attB2 et 25 nucléotides spécifiques de la séquence du gène d'intérêt (Annexe II, Tableau 2).

Les gènes candidats choisis appartenant à des familles multigéniques, nous n'avons pas retenu les gènes présentant une trop forte similarité après alignement des séquences via MUSCLE (Multiple Sequence Comparison by Log-Expectation), afin d'éviter de réprimer l'expression des gènes présentant de trop fortes similarités de séquences avec nos séquences d'intérêt. Nous avons réalisé des arbres phylogénétiques en utilisant ces alignements avec la méthode Neighbor-Joining (NJ), dans laquelle les distances (sites qui diffèrent entre deux séquences dans l'alignement réalisé précédemment) sont exprimées dans des matrices qui seront réduites à chaque étape pour créer un unique arbre phylogénétique. Les alignements et les constructions d'arbres phylogénétiques ont tous deux été réalisés grâce au logiciel MEGA.5.

Toutes les amorces et les vecteurs utilisés dans cette étude sont compatibles avec la méthode GATEWAY® (Invitrogen) et les étapes de recombinaison BP et LR ont été réalisées selon les instructions du fournisseur avec les enzymes BP (Annexe, Tableau 3) ou LR clonase (Annexe, Tableau 4, 5) (Invitrogen). Nous avons utilisé le plasmide pDONR222 (Karimi *et al.*, 2002) comme vecteur donneur (Annexe III, Figure 1). Pour les vecteurs d'expression, nous avons choisi le plasmide destinataire pJCV53 (Annexe III, Figure 2) (Karimi *et al.*, 2005) pour obtenir les lignées de surexpression et le plasmide

destinataire pK7GWIWGII RedRoot (Annexe III, Figure 3) (Karimi *et al.*, 2007) pour les lignées ARNi. Ces deux plasmides portent un gène qui code une protéine rouge fluorescente : la monomeric red fluorescent protein (mRFP) pour le plasmide pJCV53 et la DsRed pour le plasmide pK7GWIWGII RedRoot.

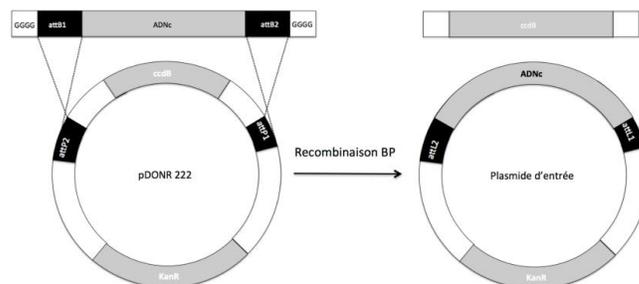


Figure 3 : Evénements de recombinaison BP. Les amplifications PCR contenant les sites attB sont insérées par recombinaison BP dans des "plasmides d'entrée" contenant les sites attP. Cette recombinaison des sites attB avec les sites attP génère des sites attL. KanR : Kanamycine Résistance.

Nous avons utilisé la souche d'*Escherichia coli* DH5α (F⁻ φ80lacZΔM15 Δ(lacZYA-argF) U169 *recA1 endA1 hsdR17*(r_K⁻, m_K⁺) *phoA supE44 λ⁻ thi-1 gyrA96 relA1*) pour toutes les procédures de clonage. Pour l'étape de clonage BP, nous avons inséré nos constructions dans le vecteur donneur pDONR222, conduisant à la production d'un plasmide d'entrée, et sélectionné l'événement de recombinaison sur milieu LB contenant 10 μg.ml⁻¹ de Kanamycine.

Après recombinaison LR par l'intermédiaire des plasmides destinataires pJCV53 et pK7GWIWGII RedRoot, et la formation des plasmides d'expression, nous avons sélectionné les bactéries sur milieu LB contenant 10 μg.ml⁻¹ de Spectinomycine et 10 μg.ml⁻¹ de Chloramphénicol (uniquement pour le vecteur pK7GWIWGII). Après sélection des clones bactériens, nous avons extrait les plasmides en utilisant le kit QIAprep® Spin Miniprep (QIAGEN) suivant les instructions du fournisseur. Nous avons quantifié la concentration de plasmides extraits par mesure du

ratio de l'absorbance à 260/280 et 260/230 nm au Nanodrop (Thermo Scientific).

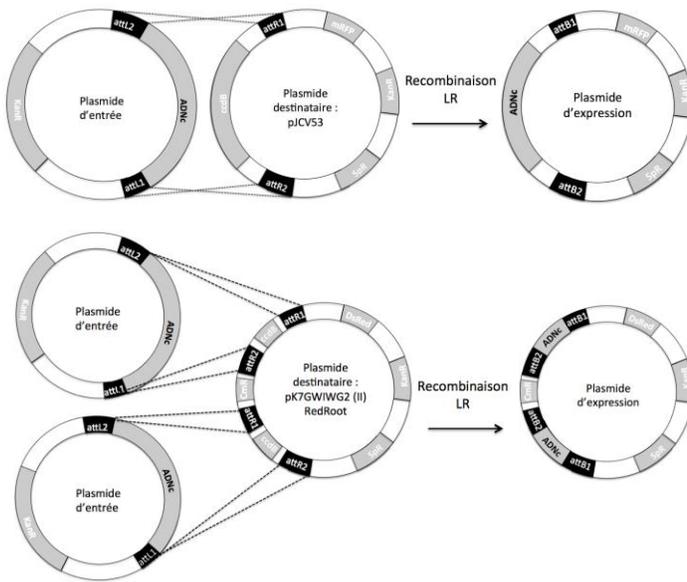


Figure 4 : Événements de recombinaison LR. Les sites attL peuvent recombiner avec les sites attR du “plasmide destinataire”, conduisant à la création d’un “plasmide d’expression” contenant l’ADNC pleine longueur ou des fragments. Cette recombinaison est unique sur les plasmides pJCV53 des lignées de surexpression. Le plasmide pK7GWIGW2 (II) RedRoot contient deux sites de recombinaison. ccdB : toxine létale, CmR : Résistance Chloramphénicol, DsRed : marqueur fluorescent, KanR : Résistance Kanamycine, mRFP : marqueur fluorescent, SpR : Résistance Spectinomycine.

Pour confirmer l’insertion de nos séquences d’intérêts dans leurs plasmides respectifs après recombinaison et transformation, nous avons réalisé des gels d’électrophorèse à 1% d’agarose après amplification PCR sur colonies bactériennes (Annexe II, Tableau 3, 4, 5). De plus, chaque vecteur d’expression a été envoyé à séquencer à la compagnie Eurofinsgenomics (Ebersberg, Germany). Nous avons par la suite recherché la présence de variant délétères dans les séquences codantes par l’intermédiaire du logiciel GenomeCompiler®.

c. Transgénèse :

Afin de générer des peupliers transgéniques dans les voies de signalisation et de biosynthèse hormonales, nous avons transformé *Populus*

tremula x alba INRA clone 717-1B4 à l’aide de la souche d’*Agrobacterium rhizogenes* ARqua4, dérivée rif^R d’Arqua1 (Crane *et al.*, 2006) contenant les constructions d’intérêts. Nous avons adapté la méthode de (Yoshida *et al.*, 2015) en y apportant les modifications suivantes. Nous avons cultivé la souche d’*A. rhizogenes* Arqua4 dans du milieu MG/L broth à 28°C pendant 16h, avant de les suspendre dans du milieu Yoshida « co-culture » jusqu’à atteindre une DO à 600 nm de 0,8. A ce stade, nous avons blessé, à l’aide d’un scalpel, la nervure centrale de feuilles de plantules de peupliers *in vitro* décrits ci-dessus. Après 5 minutes d’incubation des feuilles dans les cultures d’*A. rhizogenes* transformées avec nos plasmides spécifiques, nous avons transféré ces feuilles sur le milieu « Yoshida co-culture », afin de stimuler l’infection par *A. rhizogenes*. Après deux jours à 22°C à l’obscurité, nous avons transféré les feuilles inoculées sur milieu « Yoshida antibiotique » contenant 0,5 mg.ml⁻¹ de cefotaxime et carbamycine, que nous avons mis en culture à 22°C à l’obscurité afin d’éliminer *A. rhizogenes*. Après deux semaines de culture et l’apparition de racines chevelues (hairy-roots), nous avons transféré les feuilles sur milieu « Yoshida sélection », que nous avons mis en culture à 22°C à l’obscurité pour sélectionner spécifiquement les racines transformées. Enfin, après deux semaines de cultures, nous avons observé les systèmes racinaires à l’aide d’une loupe binoculaire à épifluorescence ZEISS DiscoveryV.8, avec pour longueurs d’ondes d’excitation 560 nm et récupéré les longueurs d’onde de 630 nm. En effet, les racines transformées par Arqua4 ont intégré nos constructions d’intérêts portant un marqueur de fluorescence mRFP pour les lignées de surexpression et DsRed pour les lignées de répression. Nous avons donc isolé les racines émettant une fluorescence rouge avant de les cultiver sur milieu « Yoshida sélection » + 0,25 µM thidiazuron (TDZ) à 24°C avec une photopériode de 16h et une intensité lumineuse de 50 µmol.m⁻².s⁻¹, dans le but de régénérer des tiges.

2) Acclimatation de vitroplants de peuplier en sol naturel pour étudier la cinétique de colonisation de leur système racinaire par les microorganismes :

a. Sol :

Afin d'étudier la dynamique de colonisation des racines de boutures peuplier par les microorganismes dans un sol naturel, nous avons prélevé du sol dans une peupleraie à l'INRA Champenoux (48.755947, 6.359460). La litière a été enlevée à l'aide d'un râteau puis 15kg de sol de surface (0-15cm) ont été prélevés. Le sol a été tamisé (2mm) pour enlever les racines et les débris puis séché à l'air libre pendant 3 jours. Nous l'avons ensuite homogénéisé et réparti 200g dans des pots fermés de 500 ml. Nous l'avons fait sécher dans une étuve à 45°C pour déterminer son poids sec (0% d'humidité), avant de le réhydrater jusqu'à saturation (100% d'humidité). Par l'intermédiaire de cette technique dite « du gobelet », nous avons fixé un taux d'humidité du sol de nos pots de 75%, que nous avons conservé par arrosages réguliers.

b. Dispositif de culture et échantillonnage :

Des entre-noeuds de deux centimètres de peupliers *Populus tremula x alba* INRA clone 717-1B4 gnotobiotiques ont été enracinés sur milieu solide MS supplémenté en IBA (2ml.L⁻¹) pendant 2 semaines et ensuite transférées sur milieu MS pour 3 semaine à 24°C avec une photopériode de 16h et une intensité lumineuse de 150 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$. Lorsque le système racinaire était suffisamment développé (deux semaines de culture à 22°C), les plantules ont été transférées dans les pots contenant 200 g de sol homogène décrit dans le paragraphe précédent, et maintenu à un taux d'humidité de 75% par pesées et arrosages réguliers. Nous avons prélevé 10 réplicats à 2 ; 5, 10, 15, 21, 30, et 50 jours. A chaque échantillonnage, parmi les 10 réplicats, les systèmes racinaires de 5 individus sont destinés aux observations microscopiques, et les 5 autres sont fixés dans de l'azote liquide et conservés à -80°C avant de procéder aux

extractions d'ADN totaux pour analyser les communautés microbiennes rhizosphériques (cf. « Extraction d'ADN et construction des banques d'amplicons pour séquençage haut débit »).

c. Marquage et microscopie :

Pour étudier l'évolution de la colonisation spatio-temporelle des racines de peupliers par des champignons endophytes, endo et ectomycorrhiziens, nous avons utilisé deux techniques complémentaires de coloration pour observations microscopiques, l'une en microscopie optique, l'autre en microscopie confocale à balayage laser.

Dans le cas de la coloration à l'encre, nous avons adapté les protocoles de (Vierheilig *et al.*, 2005). Nous avons lavé les racines à l'eau distillée, avant de les incuber à 90 °C pendant 20 minutes dans du KOH 10% afin de retirer les tanins. Après plusieurs lavages à l'eau distillée, nous avons incubé les racines 10 min à température ambiante dans du 0.1 N HCl. Après avoir retiré l'HCl sans lavage à l'eau, nous avons incubé le système racinaire 30 min à 90°C dans de l'encre acidifiée (5% Encre Waterman, 20% Acide Lactique, 75% Eau distillée) pour colorer les champignons. Enfin, nous avons lavé les racines dans de l'eau distillée avant de les monter entre lames et lamelles avec du glycérol à 20% pour observation au microscope optique OLYMPUS BX41.

Pour l'observation en microscopie confocale, nous avons fixé les racines dans du paraformaldéhyde (PFA) à 3% pendant 12h à 4°C, avant de les rincer 3 fois dans du PBS 1X (0,13 M NaCl, 7 mM Na₂HPO₄, 3 mM NaH₂PO₄, pH 7,2). L'étape suivante consiste à rincer les racines dans un volume de PBS 1X et un volume d'éthanol 90%, puis de les décolorer 2h à 90°C dans du KOH à 20 %. Après 5 rinçages à l'eau distillée, les racines sont incubées dans du PBS 1X pendant la nuit, contenant 10 μl de WGA-Alexa fluor 488 (1 mg.ml⁻¹), un marqueur fongique spécifique de la chitine, constituant de la paroi des cellules de champignon. Les racines sont ensuite lavées dans du 1X PBS, avant ajout de 10 μl ⁻¹ d'Iodure de Propidium (1 mg. ml⁻¹),

pour visualiser les cellules racinaires et identifier si le champignon se développe dans l'espace intra ou extracellulaire. Nous avons monté les racines entre lames et lamelles avec une solution de SlowFade contenant du DAPI (Life Technologies). La DAPI permet de marquer l'ADN et de visualiser les bactéries. Nous avons observé les systèmes racinaires à l'aide d'un microscope confocal ZEISS LSM 780 (ZEISS International) avec pour longueurs d'ondes d'excitation 405, 488 et 561. Nous avons ensuite superposé les différentes sections optiques de 0,39 μm obtenues et reconstitué les images à l'aide du module Maximum Intensity Projection du logiciel Zen (Zen International).

d. Extraction d'ADN et construction des banques d'amplificons pour séquençage haut débit :

Afin d'identifier les membres des communautés de microorganismes rhizosphériques, nous avons extrait les ADN génomiques présents dans les racines de peupliers pour procéder à des analyses de metabarcoding. Les ADN ont été extraits avec le kit DNeasy® Power Plant Pro (QIAGEN), selon les instructions du fournisseur. Nous avons amplifié par PCR les régions hypervariables v4 de l'ADNr 16S bactérien et de l'ITS complet fongique (Internal Transcribed Spacer), à chaque prélèvement et pour chaque réplicat. Nous avons vérifié la quantité d'ADN amplifiés par électrophorèse sur gel d'agarose 1%, avant de les faire séquencer par la plateforme GeT-Plage (INRA Toulouse).

III. Résultats :

1) Clonage de gènes de peuplier pour leur surexpression ou extinction par interférence à ARN :

a. Amplifications PCR pour la surexpression et interférence à ARN :

Le contrôle des régulations hormonales ayant un rôle clef dans les interactions mutualistes entre la racine et les microorganismes associés, nous

voulons étudier l'effet de modifications dans ces voies de régulation sur l'établissement et la composition du rhizobiome. Pour tester ces hypothèses, il faut dans un premier temps générer des lignées transgéniques de surexpression ou de répression de gènes des voies de biosynthèse et de signalisation hormonales de l'AG, de l'AS de l'ET et de la production de terpènes. Nous avons sélectionné 11 gènes candidats (Annexe, Tableau 1), d'après de précédents travaux et des connaissances issues de la littérature. Nous avons vérifié la taille de nos amplicons par migration sur gel d'électrophorèse après amplification PCR. Concernant les lignées de surexpression, les amplifications PCR attB ont une taille comprise entre 936 et 2235 bp (Figure 5).

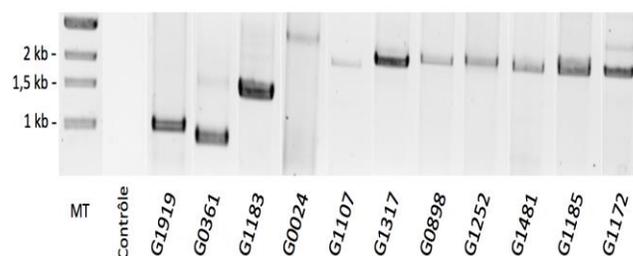


Figure 5 : Migration sur gel d'agarose à 1% des produits d'amplification PCR permettant de générer les constructions attB pour les lignées de surexpression. Amplification PCR à l'aide des amorces spécifiques attB (Annexe II, Tableau 2). Dans le cas du contrôle négatif, le matériel génétique a été remplacé par de l'eau.

Concernant les lignées de répression, les séquences des gènes NPR1-like (PtNPR1-like.G1172, PtNPR1-like.G1185 et PtNPR1-like.G1183) sont très similaires (Figure 6). Les constructions ARN interférence ne seront pas spécifiques et réprimeront l'ensemble des gènes paralogues. Nous ne les avons donc pas retenu dans les lignées de répression pour le reste de l'étude. De même, les séquences des gènes PtDELLA.1107, PtDELLA.1317 de la sous famille GAI et PtDELLA.0898, PtDELLA.1252 de la sous famille RGL des protéines DELLA sont très similaires deux à deux. Pour les mêmes raisons que précédemment, nous n'avons retenu qu'un des deux gènes paralogues dans les lignées de répression.

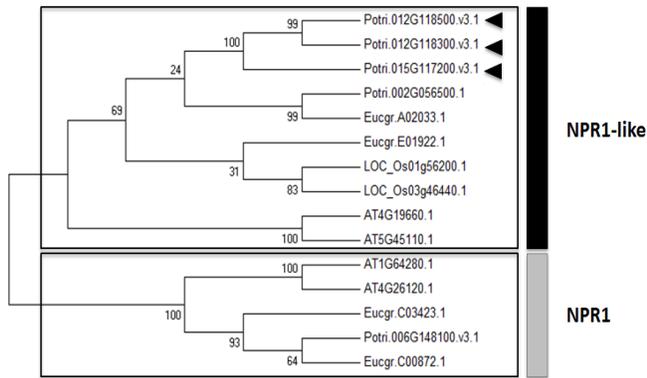


Figure 6 : Arbre phylogénétique des gènes NPR1 et NPR1-like construit selon la méthode Neighbor-Joining. Nous avons utilisé le modèle de substitution « General Time Reversible model ». Les valeurs de Bootstrap ont été obtenues à partir de 1000 répétitions selon l’algorithme Neighbor Joining. Distinction en deux principaux clades : en noir, les gènes NPR1-like, en gris : les gènes NPR1. Les flèches indiquent le regroupement des gènes PtNPR1-like.G1172, PtNPR1-like.G1185 et PtNPR1-like.G1183 dans un même clade. AT : *Arabidopsis thaliana*, Eucgr : *Eucalyptus grandis*, Os : *Oryza sativa*, Potri : *Populus trichocarpa*.

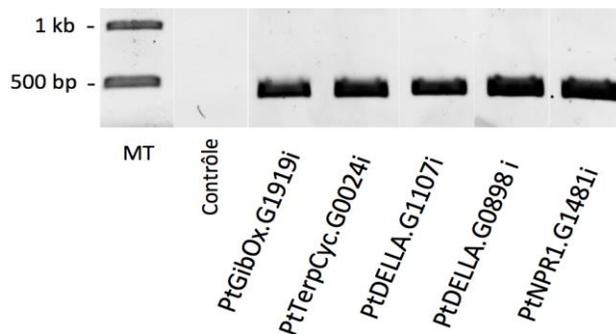


Figure 7 : Migration sur gel d’agarose à 1% des produits d’amplification PCR permettant de générer les constructions attB pour les lignées de répression RNAi. Amplification PCR à l’aide des amorces spécifiques attB (Annexe II, Tableau 2). Dans le cas du contrôle négatif, le matériel génétique a été remplacé par de l’eau.

Pour les lignées de répression, la taille des amplifications PCR varie entre 331 et 388 nucléotides (Figure 7). La visualisation des amplicons aux tailles attendues pour les lignées de surexpression et les lignées de répression permet d’envisager les étapes suivantes de clonage dans les différents vecteurs autorisant la

transformation génétique de peuplier via *A. rhizogenes* pour l’ensemble des constructions.

b. Recombinaison BP :

Après purification sur gel des amplicons flanqués des régions attB sur gel, ils sont insérés dans le plasmide donneur pDONR222 par recombinaison BP. Nous avons transformé la souche d’*E. coli* DH5α avec le plasmide d’entrée contenant notre construction de surexpression ou de répression. Nous avons vérifié la présence du plasmide dans les bactéries transformées par amplification PCR sur colonies bactériennes cultivées sur milieu sélectif. Pour les constructions nécessaires à la surexpression de gènes, les bactéries transformées avec les plasmides PtTerpCyc.G0024, PtDELLA.G0898, PtNPR1-like.G1183, PtNPR1-like.G1185 et PtDELLA.G1252 n’ont pas poussé sur milieu sélectif, suggérant que l’étape de recombinaison BP n’a pas eu lieu. Ces constructions ont donc été écartées du projet et nous avons focalisé notre travail sur les constructions PtGibOx.G1919, PtAP2.G0361, PtDELLA.G1107, PtDELLA.G1317, PtNPR1.G1481 et PtNPR1-like.G1172 pour le reste de l’étude. Les séquences qui ont été amplifiées par le couple d’amorces M13_F-M13_R sont comprises entre 1136 et 2117 bp (Figure 8), en accord avec nos prédictions après analyses des constructions sur GenomeCompiler®.

Concernant les constructions nécessaires à la répression par interférence à ARN, des clones bactériens transformés avec les plasmides d’entrée (PtGibOx.G1919i, PtTerpCyc.G0024i, PtDELLA.G1107i, PtDELLA.G0898i et PtNPR1.G1481i) ont été sélectionnés sur milieu sélectif. Après amplification PCR sur ces colonies bactériennes, à l’aide des amorces M13_F-M13_R, la taille des séquences amplifiées oscille entre 564 et 621 bp (Figure 9). Ces résultats confirment la transformation effective des bactéries avec le plasmide pDONR222 contenant le fragment d’intérêt.

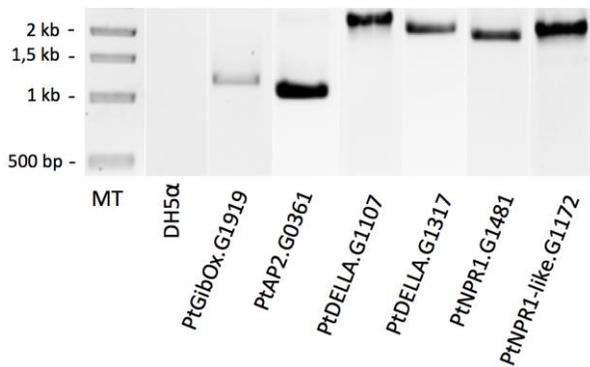


Figure 8 : Migration sur gel d'agarose à 1% des produits d'amplification pleines longueurs de la PCR sur colonies bactériennes isolées sur milieu sélectif (Annexe II, Tableau 3) avec les amorces M13_F-M13_R. Chaque puits correspond à un clone différent. Un seul clone est représenté parmi les centaines obtenus après culture sur milieu sélectif. MT : marqueur de taille. (1kb ladder). Le contrôle négatif correspond à la souche DH5α non transformée.

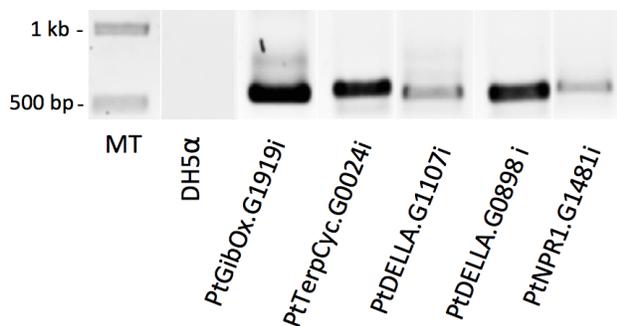


Figure 9 : Migration sur gel d'agarose à 1% des produits d'amplification ARNi de la PCR sur colonies bactériennes isolées sur milieu sélectif (Annexe II, Tableau 3) avec les amorces M13_F-M13_R. Chaque puits correspond à un clone différent. Un seul clone est représenté parmi les centaines obtenus après culture sur milieu sélectif. MT : marqueur de taille. (1 kb ladder). Le contrôle négatif correspond à la souche DH5α non transformée.

c. Recombinaison LR :

Les plasmides d'entrée pDONR222 contenant les ADNc pleine longueur ou les fragments nécessaires à la répression par interférence ARN ont été extraits et purifiés. Ces plasmides donneurs ont été recombinés avec un plasmide de destination conduisant à la création d'un plasmide d'expression. Suite à cette étape de recombinaison LR, nous avons transformé la

souche d'*E. coli* DH5α avec le plasmide d'expression contenant notre séquence d'intérêt. Nous avons vérifié la transformation des bactéries avec le plasmide d'intérêt par PCR sur colonies bactériennes isolées sur milieu sélectif. Pour les constructions nécessaires à la surexpression (gène pleine longueur), l'amplification PCR par les amorces VB006-VB007 de la région recombinée conduit à des amplicons allant de 1101 à 2082 bp (Figure 10). Les tailles de ces amplicons correspondent à nos prédictions sur GenomeCompiler, montrant que les bactéries sélectionnées ont bien intégré le vecteur d'expression pJCV53 contenant les ADNc pleine longueur des gènes d'intérêt suivants : PtGibOx.G1919, PtAP2.G0361, PtDELLA.G1107, PtDELLA.G1317, PtNPR1.G1481 et PtNPR1-like.G1172.

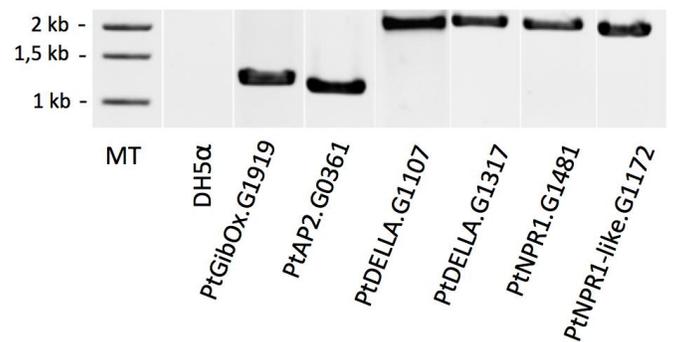


Figure 10 : Migration sur gel d'agarose à 1% des produits d'amplification pleines longueurs de la PCR sur colonies bactériennes isolées sur milieu sélectif avec les amorces VB006-VB007 (Annexe II, Tableau 4). Chaque puits correspond à un clone différent. Un seul clone est représenté parmi les centaines obtenus après culture sur milieu sélectif. MT : marqueur de taille. (1kb ladder). Le contrôle négatif correspond à la souche DH5α non transformée.

Pour les constructions requises pour déclencher la répression par interférence ARN, l'amplification PCR de la région recombinée par le couple d'amorces CmR_R-VB006 conduit à des amplicons de tailles allant de 978 à 1035 bp (Figure 11). Les tailles de ces amplicons correspondent à nos prédictions sur GenomeCompiler, montrant que les bactéries sélectionnées ont bien intégré le vecteur d'expression pK7WGIWGII contenant les fragments correspondant à nos gènes d'intérêt

suivants : PtGibOx.G1919i, PtTerpCyc.G0024i, PtDELLA.G1107i, PtDELLA.G0898i et PtNPR1.G1481i.

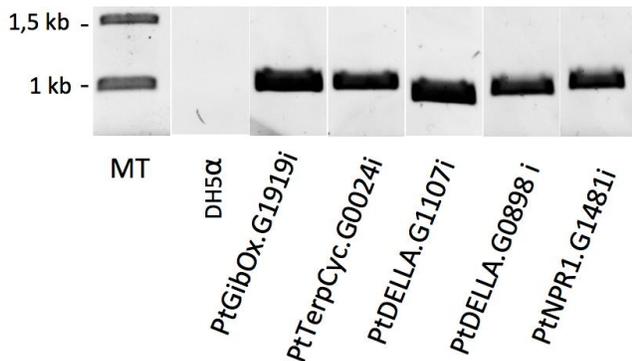


Figure 11 : Migration sur gel d'agarose à 1% des produits d'amplification ARNi de la PCR sur colonies bactériennes isolées sur milieu sélectif avec les amorces CmR_R-VB006 (Annexe II, Tableau 5). Chaque puits correspond à un clone différent. Un seul clone est représenté parmi les centaines obtenus après culture sur milieu sélectif. MT : marqueur de taille. (1kb ladder). Le contrôle négatif correspond à la souche DH5 α non transformée.

Afin de confirmer la présence de nos séquences d'intérêts dans les plasmides d'expression, et surtout, de vérifier l'absence de mutations, nous avons fait séquencer ces plasmides. Les alignements correspondent aux séquences identifiées chez *Populus trichocarpa*, ne présentent pas de variations nucléotidiques induisant un changement de cadre de lecture ou un codon stop prématuré. Ces résultats confirment l'insertion de nos constructions PCR dans les plasmides d'expression (Figure 12).

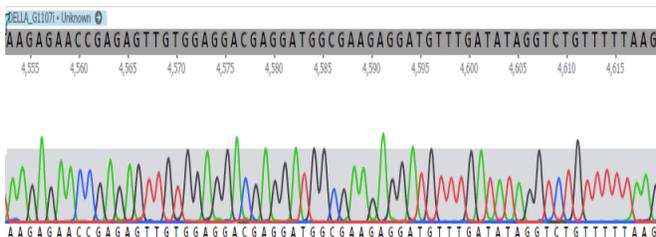


Figure 12 : Chromatogramme du séquençage de la construction PtDELLA.G1107i contenu dans le plasmide d'expression. Alignement de la séquence PtDELLA.G1107i du plasmide d'expression avec le gène Potri.010G110700 présent chez *Populus trichocarpa*.

d. Transformation d'*Agrobacterium rhizogenes* :

Afin de générer des lignées transgéniques de peupliers de surexpression et de répression, nous avons transformé la souche d'*A. rhizogenes* Arqua4 avec les plasmides d'expression obtenus précédemment. Nous avons vérifié leur intégration dans *A. rhizogenes* par PCR sur colonies bactériennes isolées sur milieu sélectif. Pour les lignées de surexpression, les amplicons obtenus par l'intermédiaire des amorces VB006-VB007 sont de la même taille qu'après amplification PCR dans DH5 α et varient toujours de 1101 à 2082 bp (Figure 13). Ces résultats confirment que nous avons obtenus des souches d'*A. rhizogenes* Arqua4 contenant les vecteurs d'expression pour les gènes suivants : PtGibOx.G1919, PtAP2.G0361, PtDELLA.G1107, PtDELLA.G1317, PtNPR1.G1481 et PtNPR1-likeG1172.

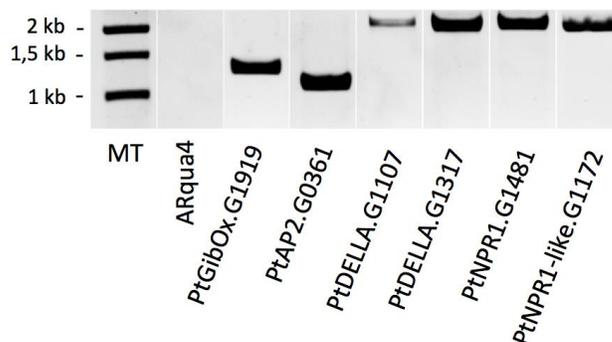


Figure 13 : Migration sur gel d'agarose à 1% des produits d'amplification pleines longueurs de la PCR sur colonies bactériennes isolées sur milieu sélectif avec les amorces VB006-VB007 (Annexe II, Tableau 4). Chaque puits correspond à un clone différent. Un seul clone est représenté parmi les centaines obtenus après culture sur milieu sélectif. MT : marqueur de taille. (1kb ladder). Le contrôle négatif correspond à la souche ARqua4 non transformée.

De même pour les lignées de répression, l'amplification PCR par le couple d'amorces CmR_R-VB006 donne des amplicons identiques à ceux amplifiés dans DH5 α et constitués de 978 à 1035 bp (Figure 14). Ces résultats confirment que nous avons obtenus des souches d'*A. rhizogenes* Arqua4 contenant les fragments correspondant à nos gènes d'intérêt suivants :

PtGibOx.G1919i, PtDELLA.G1107i, et PtNPR1.G1481i,
PtTerpCyc.G0024i, PtDELLA.G0898i

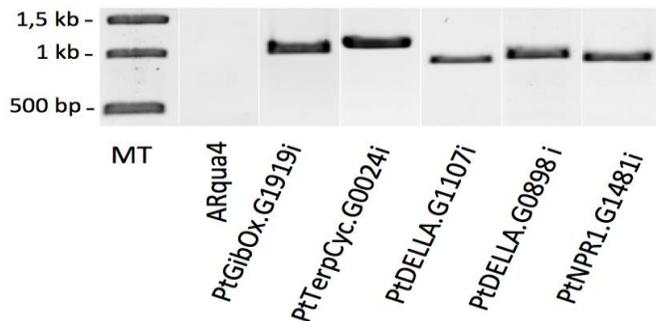


Figure 14 : Migration sur gel d'agarose à 1% des produits d'amplification ARNi de la PCR sur colonies bactériennes isolées sur milieu sélectif avec les amorces CmR_R-VB006 (Annexe II, Tableau 5). Chaque puits correspond à un clone différent. Un seul clone est représenté parmi les centaines obtenus après culture sur milieu sélectif. MT : marqueur de taille. (1kb ladder). Le contrôle négatif correspond à la souche ARqua4 non transformée.

2) Transformation de peupliers et expression des transgènes :

Pour générer des lignées transgéniques de peuplier de surexpression et de répression, nous avons transformé des feuilles de peupliers avec *A. rhizogenes* contenant nos plasmides d'expression comme décrits dans la section « clonage ». Après quatre semaines de culture, nous avons observé l'apparition de chevelus racinaires pour les lignées de surexpression PtDELLA.G1107, PtNPR1.G1481 PtGibOx.G1919, et PtDELLA.G1317, ainsi que pour les lignées de répression PtDELLA.G1107i PtGibOx.G1919i, et PtNPR1.G1481i. L'émission d'une fluorescence rouge confirme la bonne transformation des racines et la présence de nos constructions PCR contenant les marqueurs fluorescent mRFP pour les lignées de surexpression et la DsRed pour les lignées de répression (Figure 15).

Les racines exprimant la mRFP ou la DsRed sont des racines transformées et dont l'ADN-T est intégré dans une partie du génome autorisant son expression. Elles ont été transférées sur milieu sélectif afin de régénérer une plante entière. Deux

semaines à un mois de culture sont nécessaires avant d'observer l'apparition de cales et de tiges pour les plants transgéniques de surexpression ainsi que pour les lignées de répression.

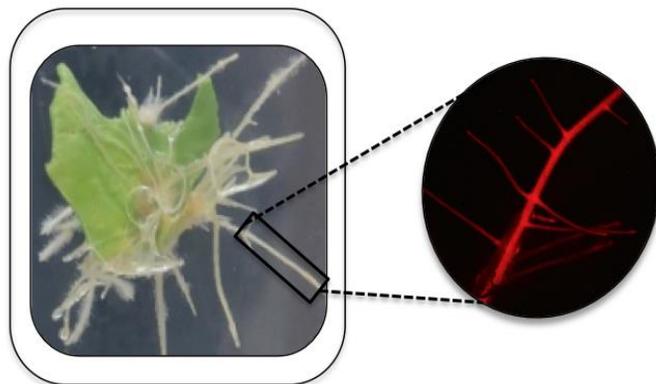


Figure 15 : Régénération du système racinaire d'un peuplier transgénique dans les voies de signalisation de l'AS. A gauche : photographie des chevelus racinaires se développant sur une feuille de peuplier transformée par *A. rhizogenes* avec la construction PtNPR1.G1481, cultivé sur milieu Yoshida selection. A droite : Observation à la loupe binoculaire d'une racine transformée avec PtNPR1.G1481. Après excitation à 560 nm, on observe une émission de fluorescence à 630 nm par la racine exprimant la mRFP.



Figure 16 : Régénération de la partie apicale d'un peuplier transgénique dans les voies de signalisation de l'AS. Développement des parties aériennes chez un peuplier surexprimant PtNPR1.G1481 cultivé sur milieu Yoshida selection + TDZ.

A ce stade, nous avons créé 2 lignées de surexpression (PtDELLA.G1107 et PtNPR1.G1481), et une de répression (PtDELLA.G1107i), dont les développements aériens témoignent de la régénération de plants transgéniques dans les voies de biosynthèse et de

signalisation hormonales (Figure 16). D'autre part, les lignées de surexpression PtGibOx.G1919 et PtDELLA.G1317 et de répression PtGibOx.G1919i, et PtNPR1.G1481i, sont au stade de régénération de racines.

3) Cinétique de colonisation racinaire par les microorganismes du sol :

a. Observations par microscopie optique et confocale :

Afin d'analyser les effets des modulations hormonales sur l'architecture du rhizobiotique par l'intermédiaire de peupliers transgéniques, nous avons, dans un premier temps, déterminé la cinétique et la dynamique de colonisation racinaire chez un peuplier témoin planté en sol naturel issu de peupleraie

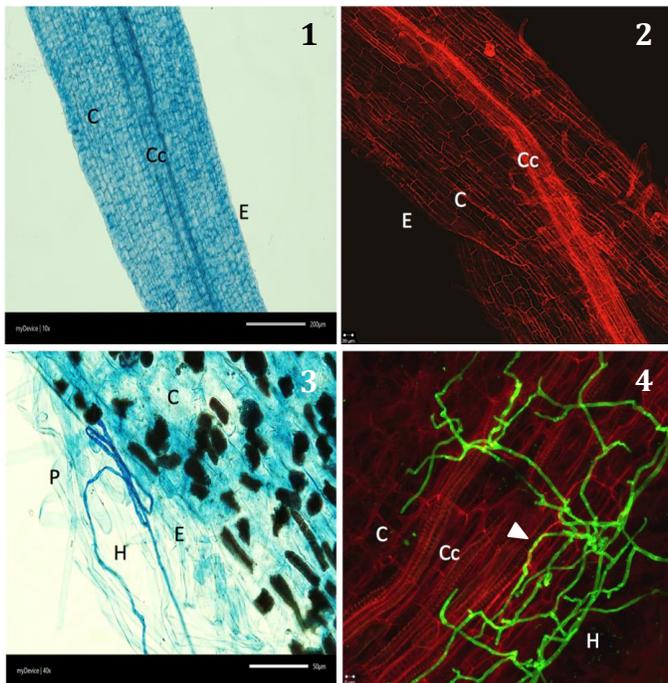


Figure 17 : Dynamique de la colonisation racinaire à T0 et T4. 1 : coloration à l'encre d'une racine principale de peuplier à T0, observation au microscope optique 10x. 2 : observation au microscope confocal d'une racine principale de peuplier à T0, 10x. 3 : coloration à l'encre d'une racine principale de peuplier observée au microscope optique 10x à T4. La flèche indique la présence d'hyphe extracellulaire. 4 : coloration au WGA-Alexa fluor 488 d'hyphes extracellulaires présents au niveau de de la racine principale à T4, observée au microscope confocal 40x. La flèche indique la présence d'hyphe extracellulaire. C : Cellule, Cc : Cylindre central, E : Epiderme, H : hyphe, P : Poil absorbant.

D'après les colorations réalisées au bleu et au WGA, deux marqueurs colorant les parois des champignons, aucun champignon n'était présent à T0, avant la mise en terre des plantules, confirmant le statut gnotobiotique du peuplier (Figure 17). Nous avons constaté l'apparition de spores et des premiers champignons au contact des racines après 2 à 4 jours de culture en terre (Figure 17). La colonisation était visible tout au long du système racinaire depuis l'apex jusqu'au collet mais était très hétérogène d'une plante à l'autre ; certains systèmes racinaires étaient densément colonisés tandis que d'autres ne portaient que quelques hyphes fongiques. Aucune colonisation intracellulaire n'était observable à ce stade. Les hyphes de ces champignons extracellulaires étaient septés et de diamètre supérieur à 1 μm et présentaient peu de diversité de structures sur une base morphologique.

Nous avons observé les premières structures fongiques à l'intérieur des racines après 7 jours de culture. En effet, nous avons pu constater le développement d'hyphes se propageant entre les cellules dans les compartiments apoplasmiques, et principalement dans les régions épidermiques (Figure 18). Ces colonisations apoplasmiques restaient très hétérogènes le long de la racine, malgré une densité plus importante de mycélium à l'apex et dans la zone d'élongation. Nous avons remarqué les prémices d'une colonisation intracellulaire ainsi qu'une exacerbation de la colonisation apoplasmique après 10 jours de culture. En effet, d'après nos observations au microscope confocal, nous avons constaté la présence d'hyphes semblant transpercer de part et d'autre les parois cellulaires, et se propageant de cellule en cellule (Figure 18). Bien que la diversité morphologique de champignons reste faible à ce stade de développement, nous avons remarqué la présence de champignons septés et non, dont les hyphes avaient des diamètres supérieurs ou inférieurs à 1 μm . Entre 15 et 21 jours de culture, nous avons constaté une importante augmentation de la densité et de la diversité morphologique de champignons observés. Nous avons identifié au sein d'une même région racinaire la présence de deux morphologies fongiques majeures. La première,

constituée d'hyphes d'environ 1 μm de diamètre, se développe dans le compartiment intracellulaire sous forme d'arbuscules, non sans rappeler la morphologie des champignons endomycorhiziens de type AM. Le second type morphologique comporte des hyphes d'un diamètre avoisinant les 5 μm et ressemblant fortement à des villosités intestinales. D'autre part, les champignons intracellulaires se développent sous la forme d'un réseau qui se structure en un quadrillage se superposant à l'architecture cellulaire, et se propage en direction du cylindre central. L'apparition des racines latérales après 15 jours de culture corrobore avec le développement de mycéliums extracellulaires et l'établissement des premières ectomycorhizes à partir de 21 jours. Ces observations traduisent une tendance à l'homogénéisation de la colonisation endo-racinaire ainsi qu'une augmentation globale de la densité de champignons aussi bien endo-racinaire qu'extracellulaire.

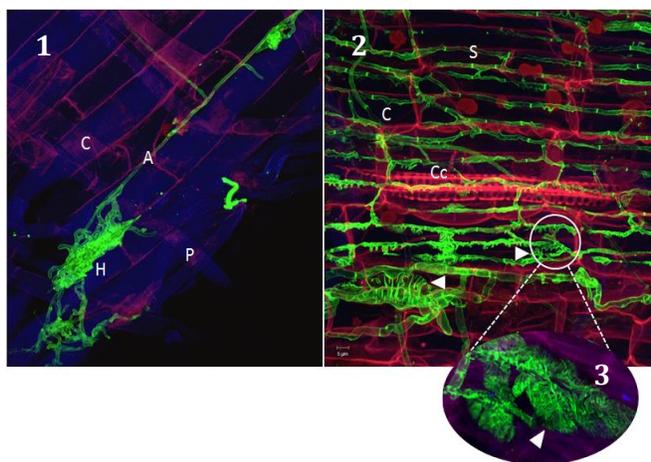


Figure 18 : Dynamique de la colonisation racinaire à T7 et T21. 1 : coloration au WGA-Alexa fluor 488 d'hyphes se développant dans le compartiment apoplasmique d'une racine principale de peuplier. Observation au microscope confocal 40x. 2 : coloration au WGA-Alexa fluor 488 de deux structures fongiques d'une racine principale de peuplier, observée au microscope confocal 40x. Les deux flèches indiquent les structures « villosités » et AM. 3 : coloration au WGA-Alexa fluor 488 d'une structure AM dans l'espace intracellulaire. La flèche indique les architectures arbusculaires. Observation au microscope confocal 40x. A : apoplaste, C : Cellule, Cc : cylindre central, H : hyphes, P : Poil absorbant, S : septa.

A partir de 30 jours et ce jusqu'à 50 jours, la densité de champignons présents dans les systèmes racinaires augmente fortement, et certains systèmes racinaires ont l'ensemble de leurs cellules entièrement colonisées. Nous avons quantifié une importante proportion de champignons extracellulaires, et en moyenne, plus de 37% des racines latérales étaient ectomycorhizées ou en cours de colonisation. Nous avons remarqué la présence d'hyphes fongiques septés et d'un diamètre inférieur à 1 μm situés à l'apex des racines latérales mycorhizées. Toutefois, nous avons observé une certaine hétérogénéité des densités de champignons et de taux de mycorhization d'un système racinaire à l'autre et nous avons remarqué une diminution de la diversité des champignons endo-racinaire au sein des différentes structures racinaires. En effet, dans les racines latérales, cette transition est accompagnée par une diminution des champignons rappelant les AM au profit des champignons « villosités », tandis que nous observons la tendance inverse dans les racines principales. Pour les racines principales comme latérales, les champignons AM ont tendance à se développer autour du cylindre central tandis que les champignons « villosités » sont majoritaires proches des cellules épidermiques. Pour les racines latérales en voie de mycorhization, cette succession semble être accompagnée par le remplacement des AM par les ECM. Nous avons constaté l'établissement d'un réseau d'hyphes fongiques semblable au réseau de Hartig dès 21 jours dans les racines mycorhizées, circulant dans l'espace apoplasmique en enveloppant les cellules. D'autre part, nous avons constaté la présence d'endophytes bruns septés aux parois mélanisées ainsi que l'apparition de deux nouvelles structures fongiques. La première, intracellulaire, en forme de « sac de billes », est constituée d'hyphes d'un diamètre inférieur à 1 μm , se retrouve aussi bien dans les racines latérales que principales (Figure 19). La seconde n'est présente que dans les racines latérales et mycorhizées, et constituée de courts hyphes dont le diamètre est supérieur à 1 μm et qui prennent la forme de « clefs grecques » (Figure 19). Nous n'avons pas réussi à déterminer ni la localisation exacte de ces

« clefs » dans les compartiments intra ou intercellulaire, ni leur origine. Toutefois, d'après certaines observations (Figure 19), il semblerait que ces structures proviennent des champignons « villosités », antérieurement présents et qui se différencient dans les racines latérales et mycorhizées.

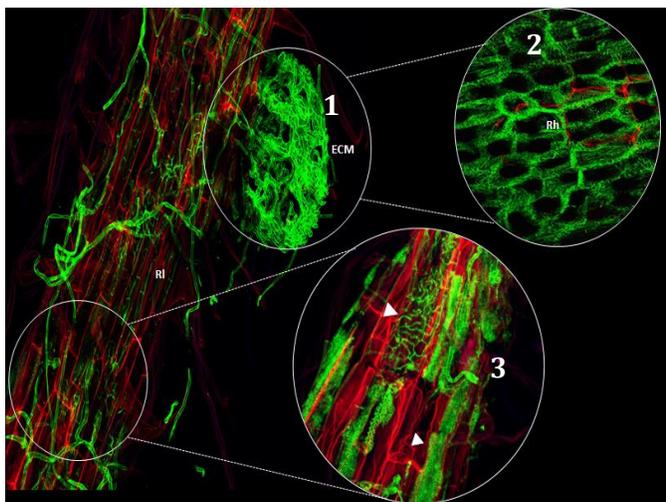


Figure 19 : Dynamique de la colonisation racinaire à T30 et formation d'une ECM. 1 : coloration au WGA-Alexa fluor 488 des hyphes d'une ECM se développant sur une racine latérale. Observation au microscope confocal 40x. 2 : coloration au WGA-Alexa fluor 488 du réseau de hartig d'une ECM observée au microscope confocal 40x. 3 : coloration au WGA-Alexa fluor 488 des différentes structures fongiques présentes dans la racine latérale, observées au microscope confocal 40x. Les flèches indiquent les structures en forme de « clefs grecques » et de « sac de billes ». ECM : Ectomycorhize, Rh: Réseau de hartig, Rl: Racine latérale.

b. Extraction ADN et Metabarcoding :

Pour identifier les microorganismes de l'endorhizosphère, nous avons extrait les ADN présents dans les systèmes racinaires des peupliers, prélevés aux différents stades de développement étudiés. Les résultats des amplifications PCR corrélaient avec les observations microscopiques. Concernant les amplifications ITS, aucun produit PCR n'est détectable à T0, T2 et T4. La présence de champignons à partir de T7 est confirmée par la présence d'amplicons sur les gels (Figure 20). Dans le cas des bactéries, les premières amplifications 16S sont visibles à T2 (Figure 20).

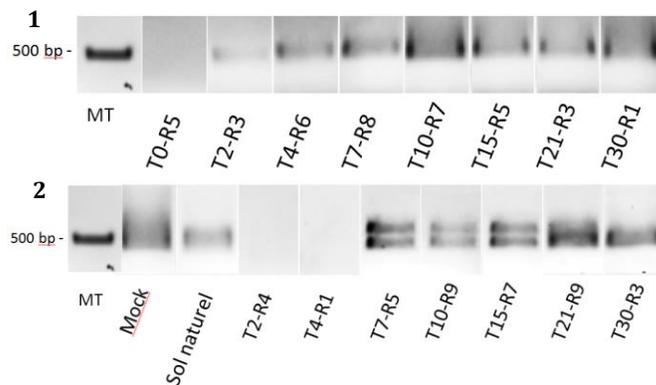


Figure 20 : Amplification PCR des régions 16S (ADN bactérien) et ITS (champignons). 1 : amplification PCR de la région 16S. 2 : amplification PCR de la région ITS-2. Les T correspondent au temps de prélèvement et R aux réplicats utilisés. MT : marqueur de taille (1 kb ladder), Mock : communauté fongique artificielle.

IV. Discussion :

Les plantes ont développé une multitude de systèmes de perception leur permettant d'appréhender leur environnement. Certains se traduisent par des cascades de signalisations et de dialogues moléculaires, notamment lors de colonisation par des microorganismes. L'ET, l'AJ, l'AS et l'AG sont les quatre hormones majeures impliquées dans l'équilibre croissance / immunité et sont induites lors d'attaques par des microorganismes pathogènes ou des parasites. Des études récentes suggèrent que ces hormones pourraient également avoir un rôle plus général dans la régulation des tissus des plantes par les microorganismes non pathogènes (Plett *et al.*, 2014b; Schlaeppli & Bulgarelli, 2015). Toutefois, le rôle exact chez les arbres est mal connu. De ce fait, dans un premier temps, notre objectif consiste à réaliser des lignées transgéniques de peupliers dans les voies de signalisation et de production de l'AG, l'AS, l'ET et la production de terpènes, afin, dans un second temps, de déterminer leur rôle dans l'établissement du rhizobiome.

En résumé, à partir des 11 gènes candidats que nous avons ciblés au commencement du projet, nous avons généré 4 lignées transgéniques de surexpression dans les voies de biosynthèse de l'AG (PtGibOx.G1919), de signalisation de l'AG

(PtDELLA.G1107, PtDELLA.G1317) et de l'AS (PtNPR1.G1481) (Annexe II, Tableau 6). D'autre part, afin d'observer les phénotypes supposés opposés, nous avons généré trois lignées transgéniques de répression de ces mêmes voies de signalisation, respectivement PtGibOx.G1919i, PtDELLA.G1107i, PtNPR1G1481i. Parmi les 7 gènes candidats restant, nous avons transformé *A. rhizogenes* avec deux constructions de surexpression, en attente de transformation chez le peuplier. La première correspond à la voie de signalisation de l'ET (PtAP2.G0361), et la seconde à la voie de signalisation de l'AS (PtNPR1-like.G1172). De même, nous avons transformé *A. rhizogenes* avec deux constructions de répression, dans les voies de production de terpènes (PtTerCyc.G0024i), et dans les voies de signalisation de l'AG (PtDELLA.G0898i). Parmi les 11 gènes que nous avons ciblés, l'insertion lors de la recombinaison BP de 5 constructions de surexpression dans les voies de la production de terpènes (PtTerCyc.0024), de la signalisation de l'AG (PtDELLA.G0898, PtDELLA.G1252), et de la signalisation de l'AS (PtNPR1-like.G1185, PtNPR1-like.G1183), a échoué. L'optimisation à 50 femtomoles de la quantité d'ADN des constructions PCR attB nécessaires à la recombinaison BP pourrait résoudre ce problème. Après transformation des feuilles de peupliers avec *A. rhizogenes* portant nos constructions de surexpression et d'interférence à ADN, nous avons observé les premiers développements de racines après 2 mois de culture. Deux autres mois ont été nécessaires avant l'apparition des prémices de tiges, et 4 mois de plus avant régénération d'une plantule entière. Au moins huit mois sont donc requis afin de générer des lignées transgéniques nous permettant d'étudier l'effet de ces modulations hormonales sur l'établissement et la composition du rhizobioïme. De ce fait, nous n'avons pas pu analyser au cours de cette étude l'impact des mutations réalisées sur le rhizobioïme, travail qui sera réalisé ultérieurement dans le laboratoire. Sur la base des travaux réalisés sur d'autres plantes les réponses attendues sont les suivantes.

Concernant le rhizobioïme bactérien (Carvalhais *et al.*, 2013, 2015; Lebeis *et al.*, 2015) ont démontré que la composition du microbiome racinaire bactérien chez *A. thaliana* était, du moins en partie, sous l'influence des régulations hormonales. Par exemple, (Carvalhais *et al.*, 2015) ont constaté que la composition du microbiome, ainsi que les profils d'exsudats racinaires, chez des lignées transgéniques d'arabette défectueuses dans les voies de signalisation de l'AJ, différaient de ceux des plantes sauvages. Ces résultats suggèrent la contribution de l'AJ et des métabolites secondaires dépendant des voies hormonales, dans l'assemblage des communautés bactériennes constituant le rhizobioïme. D'autre part, (Lebeis *et al.*, 2015) ont démontré que la composition du microbiome racinaire de lignées transgéniques d'*A. thaliana* défectueuses ou hyperimmunes dans les voies de signalisation et de production de l'AS, de l'AJ et de l'ET, différait des souches sauvages. Ces auteurs ont constaté une variation de l'abondance de certains taxa bactérien (e.g. Firmicutes moins abondantes et Protéobactéries plus abondantes) dans le rhizobioïme des plantes transgéniques *npr1* déficientes dans la voie de signalisation de l'AS, en comparaison avec le rhizobioïme des lignées sauvages (Lebeis *et al.*, 2015). Ces résultats suggèrent que les voies de production et de signalisation de l'AS interviennent quantitativement sur la composition du rhizobioïme et qualitativement sur la présence de certains taxa bactérien, normalement exclus chez les souches sauvages. Ces analogies corroborent avec les travaux réalisés et non publiés par Lauralie Mangeot-Peter dans le cadre de sa thèse au sein de l'UMR 1136. Elle a démontré que la structure des communautés fongiques et dans une moindre mesure des communautés bactérienne constituant le rhizobioïme, différaient entre des peupliers sauvages et des lignées transgéniques exprimant la protéine fongique MiSSP7. Cette dernière pénètre dans les noyaux des cellules racinaires de peuplier et bloque la voie de signalisation de l'AJ.

D'après les travaux antérieurs réalisés sur *A. thaliana* et le rôle essentiel de l'AS dans les réponses immunitaires et les interactions avec les

microorganismes bactériens (Robert-Seilaniantz *et al.*, 2011), nous pensons observer un changement majeur de la diversité et de l'abondance des genres bactériens présents dans les racines des lignées transgéniques surexprimant (PtNPR1.G1481) ou réprimant (PtNPR1G1481i) les gènes impliqués dans ces voies de signalisation de l'AS, en comparaison avec des peupliers sauvages. L'établissement du rhizobiotisme bactérien devrait être altéré et certains taxons, normalement exclus chez les peupliers sauvages ou dans les lignées de surexpression, pourraient faire leur apparition chez les lignées d'interférence à ADN. L'exacerbation ou l'absence de compétition bactérienne dans ces lignées transgéniques pourrait influencer l'établissement de certaines espèces bactériennes ou fongiques au détriment d'autres.

L'établissement du microbiome racinaire bactérien n'est pas l'unique cible des régulations hormonales. Les racines de peuplier ont la particularité rare d'être colonisées aussi bien par des endophytes, que des endo et ectomycorrhiziens. Ainsi, l'établissement de ces interactions pourrait être impacté dans les peupliers transgéniques. Au bas mot, cinq études ont démontré une altération de la mycorhization des ECM et AM chez des lignées transgéniques de peuplier (Plett *et al.*, 2014b), de tabac (Riedel *et al.*, 2008), de tomates (Herrera-Medina *et al.*, 2008), et de pois (Foo *et al.*, 2013, 2016), dans les voies de production ou de signalisation de l'ET, l'AS, l'GA et de l'JA. A titre d'exemple, (Foo *et al.*, 2016) ont mis en évidence l'augmentation du taux de mycorhizes chez des lignées transgéniques de pois insensibles à l'éthylène. De plus, ces mêmes auteurs ont constaté une réduction de la colonisation racinaire par le champignon arbusculaire *Glomus intraradices* chez des lignées de pois transgéniques délétères dans les voies de signalisation de l'AG, notamment via la répression de la voie de signalisation initiée par les protéines DELLA (Foo *et al.*, 2013). D'autre part, (Plett *et al.*, 2014b) ont observé des perturbations de la mycorhization entre *L. bicolor* et des peupliers transgéniques affectés soit dans la biosynthèse, soit dans la signalisation de l'ET.

Les lignées transgéniques produisant plus d'ET avaient un réseau de Hartig significativement moins profond et développé, signe d'une colonisation fongique moins efficace, que les lignées sauvages et insensibles à l'ET. Le peuplier abritant en plus d'espèces fongiques mycorrhiziennes, des champignons endophytes, (Camehl *et al.*, 2010) ont démontré l'exacerbation de la colonisation racinaire de lignées transgéniques d'*A. thaliana* défectueuses dans les voies de signalisation de l'ET, par l'endophyte *Piriformospora indica*. D'autre part, dans cette même étude, les auteurs ont constaté le phénotype inverse, à savoir une diminution de la colonisation racinaire, chez des lignées transgéniques surexprimant l'ET, soulignant l'importance de cette hormone dans la colonisation intracellulaire par des organismes endophytes. De plus, Veronica Basso a démontré dans ses travaux de thèses que des traitements exogènes à l'AJ et l'AG diminuent le pourcentage de mycorhization chez le modèle symbiotique peuplier-*L. bicolor*. Ces résultats confirment le rôle déterminant du contrôle des régulations des voies hormones dans l'établissement du rhizobiotisme fongique (Puga-Freitas & Blouin, 2015).

La colonisation du système racinaire par les différents microorganismes étant un processus très dynamique durant lequel différents types de microorganismes peuvent se succéder, il est important de connaître la dynamique de colonisation des racines pour définir de manière pertinente les temps d'échantillonnage permettant d'analyser le rôle des différentes hormones.

De ce fait, nous avons analysé par microscopie optique, confocale et séquençage de marqueurs taxonomiques fongiques et bactériens, la cinétique de colonisation du système racinaire de clones de peupliers sauvage pendant 50 jours, afin de comparer ultérieurement les changements des communautés bactériennes et fongiques endo-rhizosphériques chez les lignées transgéniques générées. Les observations microscopiques nous ont permis de constater l'existence d'une succession spatio-temporelle des champignons colonisateurs endophytes, AM et ECM. Nous avons constaté les premières

présences fongiques extracellulaires après 4 jours de cultures dans un sol naturel. Cette présence externe est rapidement suivie, après 7 jours de culture, par les prémices d'une colonisation interne. Dans un premier temps, il semblerait que les hyphes observés se développent dans le compartiment intercellulaire, pour dans un second temps, occuper l'espace intracellulaire après 10 jours. Les hyphes se propagent le long des structures cellulaires, certains traversant les cellules, et quadrillent la racine depuis l'épiderme en direction du cylindre central. Nous avons mis en évidence la présence de deux structures fongiques majeures au sein d'une même région racinaire. Une première structure intracellulaire, proche du cylindre central, que nous avons identifié comme des vésicules d'AM, et une seconde en forme de « villosités », plus proche de l'épiderme, que nous n'avons pas pu associer à des structures connues dans la littérature. La localisation cellulaire précise de cette seconde structure est beaucoup moins évidente, bien que les hyphes se développent dans le compartiment apoplasmique. Le développement des racines latérales entre 15 et 21 jours de culture est corrélé avec l'apparition des ECM et le remplacement progressif des premières structures observées. A partir de 30 et ce jusqu'à 50 jours, les champignons « villosités » des racines principales disparaissent au profit des AM. La tendance est inverse dans les racines latérales où les AM sont évincés par les structures fongiques « villosités », puis par les ECM dans les racines mycorhizées. Nous avons observé le développement des ECM autour des racines latérales mycorhizées, formant le manteau mycélien et se propageant dans les compartiments apoplasmiques de cellules donnant lieu au réseau de Hartig. Cette transition est largement documentée chez l'eucalyptus (Chilvers *et al.*, 1987), mais peu d'études anatomiques ont été réalisées chez le peuplier (Lodge & Wentworth, 1990). La colonisation primaire par les AM est associée à une meilleure capacité d'inoculation et rapidité de colonisation de ces champignons, tandis que les ECM sont plus performant pour coloniser les racines latérales via la propagation de leurs hyphes (Chilvers *et al.*, 1987). Toutefois, d'après nos observations, il semblerait que le développement

des ECM peut débuter aussi bien à l'apex de la racine latérale, qu'à sa jonction avec la racine principale. Les ECM n'ont aucun mal à coloniser les régions antérieurement occupées par les AM, mais la formation du manteau mycélien fait obstacle à une future infection par les AM (Gehring *et al.*, 2006).

D'autre part, nous avons constaté l'apparition de deux nouvelles structures fongiques. La première morphologie fongique n'est présente que dans les racines latérales et mycorhizées où elle se structure en forme de « clefs grecques ». Il reste difficile de déterminer l'origine de cette nouvelle architecture, endémique ou externe, mais il semblerait qu'elle provienne d'une évolution structurale des champignons « villosités » déjà présents, les clefs grecques résultant de la fusion de ces « villosités ». En effet, certaines observations entre T7 et T15 témoignent de leur présence originelle clairsemée dans les racines principales. Ces champignons « villosités » sembleraient se développer dans le compartiment apoplasmique, voire intracellulaire des racines principales, pour évoluer en ECM au contact des racines latérales et mycorhizées, enroulant les cellules racinaires et prenant le motif de « clefs grecques ». L'observation au microscope confocal, d'un hyphe se propageant depuis une racine principale (où il est sous forme villosité) vers une racine latérale ectomycorhizée, tend à affirmer la polyvalence de ce champignon, et la co-existence, au moins temporaire d'AM et d'ECM dans les racines mycorhizées.

Concernant la seconde structure, elle est présente dans les racines principales et latérales, et semble être localisée dans le compartiment intracellulaire où elle prend la forme de « sac de billes ». Ses hyphes se propagent aussi bien dans les compartiments apoplasmiques qu'intracellulaire, et son architecture n'est pas sans rappeler certains DSE, notamment *Acephala applanta*. (Lukešová *et al.*, 2015) ont démontré que certains endophytes ont la possibilité d'établir des symbioses mycorhiziennes avec des espèces ligneuses des forêts européennes. En effet, bien que leur rôle écophysique ne soit pas encore établi, les champignons endophytes constituent

ne fraction majeure du microbiome des racines des plantes sauvages et cultivées ainsi que des écosystèmes forestiers, où ils sont plus nombreux que les taxons mycorhiziens chez le peuplier (Bonito *et al.*, 2014; Hacquard *et al.*, 2015). Cependant, nos méthodes d'observations constituent une première approche, et ne nous permettent que de suggérer une cinétique de colonisation ainsi que les coexistences de différentes structures fongiques, sans considérer le microbiome bactérien. Les futures analyses d'empreintes génétiques des communautés présentes nous permettront d'affirmer les hypothèses émises lors des observations microscopiques, en plus d'identifier l'évolution du rhizobiome racinaire fongique et bactérien. Ces méthodes, extrapolées aux lignées transgéniques que nous avons créées, nous permettront d'approfondir notre compréhension du rôle des régulations hormonales dans l'établissement du rhizobiome chez le peuplier.

V. Conclusion :

Loin d'être isolées dans leur monde photosynthétique, les plantes entretiennent des relations complexes avec leur microbiome racinaire. Parmi les phytohormones, l'AS, l'AJ, l'AG et l'ET jouent un rôle prépondérant dans les balances croissance-immunité et sont impliquées dans les interactions avec certains microorganismes. Les lignées transgéniques de peuplier que nous avons générées dans les voies de signalisation et de biosynthèse hormonales de l'AS et de l'AG offriront un bon modèle d'étude adapté à la compréhension du rôle de ces hormones dans l'établissement du rhizobiome. En attendant la régénération complète des lignées transgéniques, nous avons pu déterminer l'existence d'une succession de morphologies fongiques dans les racines de peupliers sauvages sur 50 jours. L'utilisation de séquençage haut débit des empreintes taxonomiques fongiques et bactériennes nous permettra d'affiner l'identification des communautés présentes dans le microbiome racinaire, afin de le comparer ultérieurement au rhizobiome des lignées transgéniques. Ces analyses permettront d'approfondir la compréhension des modulations

hormonales dans l'établissement du rhizobiome, phénomène d'autant plus important lorsque l'on connaît l'apport de ce microbiome sur la plante et le contexte économique actuel de la filière forestière : production de matière ligneuse, bio-carburants...

Bibliographie :

Badri DV, Vivanco JM. 2009. Regulation and function of root exudates. *Plant, Cell & Environment* **32**: 666–681.

Bakker PAHM, Pieterse CMJ, de Jonge R, Berendsen RL. 2018. The Soil-Borne Legacy. *Cell* **172**: 1178–1180.

Beckers B, Op De Beeck M, Weyens N, Boerjan W, Vangronsveld J. 2017. Structural variability and niche differentiation in the rhizosphere and endosphere bacterial microbiome of field-grown poplar trees. *Microbiome* **5**.

Bonito G, Reynolds H, Robeson MS, Nelson J, Hodkinson BP, Tuskan G, Schadt CW, Vilgalys R. 2014. Plant host and soil origin influence fungal and bacterial assemblages in the roots of woody plants. *Molecular Ecology* **23**: 3356–3370.

Bulgarelli D, Schlaeppli K, Spaepen S, van Themaat EVL, Schulze-Lefert P. 2013. Structure and Functions of the Bacterial Microbiota of Plants. *Annual Review of Plant Biology* **64**: 807–838.

Camehl I, Sherameti I, Venus Y, Bethke G, Varma A, Lee J, Oelmüller R. 2010. Ethylene signalling and ethylene-targeted transcription factors are required to balance beneficial and nonbeneficial traits in the symbiosis between the endophytic fungus *Piriformospora indica* and *Arabidopsis thaliana*. *The New Phytologist* **185**: 1062–1073.

Carvalhais LC, Dennis PG, Badri DV, Kidd BN, Vivanco JM, Schenk PM. 2015. Linking Jasmonic Acid Signaling, Root Exudates, and Rhizosphere Microbiomes. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **28**: 1049–1058.

Carvalhais LC, Dennis PG, Badri DV, Tyson GW, Vivanco JM, Schenk PM. 2013. Activation of the Jasmonic Acid Plant Defence Pathway

- Alters the Composition of Rhizosphere Bacterial Communities (D Arnold, Ed.). *PLoS ONE* **8**: e56457.
- Chilvers GA, Lapeyrie FF, Horan DP. 1987.** ECTOMYCORRHIZAL VS ENDOMYCORRHIZAL FUNGI WITHIN THE SAME ROOT SYSTEM. *New Phytologist* **107**: 441–448.
- Crane C, Wright E, Dixon RA, Wang Z-Y. 2006.** Transgenic Medicago truncatula plants obtained from Agrobacterium tumefaciens - transformed roots and Agrobacterium rhizogenes-transformed hairy roots. *Planta* **223**: 1344–1354.
- Ditengou FA, Müller A, Rosenkranz M, Felten J, Lasok H, van Doorn MM, Legué V, Palme K, Schnitzler J-P, Polle A. 2015.** Volatile signalling by sesquiterpenes from ectomycorrhizal fungi reprogrammes root architecture. *Nature Communications* **6**: 6279.
- Felten J, Kohler A, Morin E, Bhalerao RP, Palme K, Martin F, Ditengou FA, Legue V. 2009.** The Ectomycorrhizal Fungus *Laccaria bicolor* Stimulates Lateral Root Formation in Poplar and Arabidopsis through Auxin Transport and Signaling. *PLANT PHYSIOLOGY* **151**: 1991–2005.
- Foo E, McAdam EL, Weller JL, Reid JB. 2016.** Interactions between ethylene, gibberellins, and brassinosteroids in the development of rhizobial and mycorrhizal symbioses of pea. *Journal of Experimental Botany* **67**: 2413–2424.
- Foo E, Ross JJ, Jones WT, Reid JB. 2013.** Plant hormones in arbuscular mycorrhizal symbioses: an emerging role for gibberellins. *Annals of Botany* **111**: 769–779.
- Gehring CA, Mueller RC, Whitham TG. 2006.** Environmental and genetic effects on the formation of ectomycorrhizal and arbuscular mycorrhizal associations in cottonwoods. *Oecologia* **149**: 158–164.
- Gottel NR, Castro HF, Kerley M, Yang Z, Pelletier DA, Podar M, Karpinets T, Uberbacher E, Tuskan GA, Vilgalys R, et al. 2011.** Distinct Microbial Communities within the Endosphere and Rhizosphere of *Populus deltoides* Roots across Contrasting Soil Types. *Applied and Environmental Microbiology* **77**: 5934–5944.
- Hacquard S, Garrido-Oter R, González A, Spaepen S, Ackermann G, Lebeis S, McHardy AC, Dangl JL, Knight R, Ley R, et al. 2015.** Microbiota and Host Nutrition across Plant and Animal Kingdoms. *Cell Host & Microbe* **17**: 603–616.
- Hacquard S, Spaepen S, Garrido-Oter R, Schulze-Lefert P. 2017.** Interplay Between Innate Immunity and the Plant Microbiota. *Annual Review of Phytopathology* **55**: 565–589.
- Heck C, Kuhn H, Heidt S, Walter S, Rieger N, Requena N. 2016.** Symbiotic Fungi Control Plant Root Cortex Development through the Novel GRAS Transcription Factor MIG1. *Current Biology* **26**: 2770–2778.
- van der Heijden MGA, Martin FM, Selosse M-A, Sanders IR. 2015.** Mycorrhizal ecology and evolution: the past, the present, and the future. *New Phytologist* **205**: 1406–1423.
- Herrera-Medina MJ, Tamayo MI, Vierheilig H, Ocampo JA, García-Garrido JM. 2008.** The Jasmonic Acid Signalling Pathway Restricts the Development of the Arbuscular Mycorrhizal Association in Tomato. *Journal of Plant Growth Regulation* **27**: 221–230.
- Huang X-F, Chaparro JM, Reardon KF, Zhang R, Shen Q, Vivanco JM. 2014.** Rhizosphere interactions: root exudates, microbes, and microbial communities. *Botany* **92**: 267–275.
- Jones JDG, Dangl JL. 2006.** The plant immune system. *Nature* **444**: 323–329.
- Karimi M, De Meyer B, Hilson P. 2005.** Modular cloning in plant cells. *Trends in Plant Science* **10**: 103–105.
- Karimi M, Depicker A, Hilson P. 2007.** Recombinational Cloning with Plant Gateway Vectors. *PLANT PHYSIOLOGY* **145**: 1144–1154.
- Karimi M, Inzé D, Depicker A. 2002.** GATEWAY™ vectors for Agrobacterium-mediated plant transformation. *Trends in Plant Science* **7**: 193–195.

- Kiers ET, Duhamel M, Beesetty Y, Mensah JA, Franken O, Verbruggen E, Fellbaum CR, Kowalchuk GA, Hart MM, Bago A. 2011.** Reciprocal rewards stabilize cooperation in the mycorrhizal symbiosis. *science* **333**: 880–882.
- Kloppholz S, Kuhn H, Requena N. 2011.** A Secreted Fungal Effector of *Glomus intraradices* Promotes Symbiotic Biotrophy. *Current Biology* **21**: 1204–1209.
- Krause K, Henke C, Asiimwe T, Ulbricht A, Klemmer S, Schachtschabel D, Boland W, Kothe E. 2015.** Biosynthesis and Secretion of Indole-3-Acetic Acid and Its Morphological Effects on *Tricholoma vaccinum*-Spruce Ectomycorrhiza (D Cullen, Ed.). *Applied and Environmental Microbiology* **81**: 7003–7011.
- Lareen A, Burton F, Schäfer P. 2016.** Plant root-microbe communication in shaping root microbiomes. *Plant Molecular Biology* **90**: 575–587.
- Lebeis SL, Paredes SH, Lundberg DS, Breakfield N, Gehring J, McDonald M, Malfatti S, Glavina del Rio T, Jones CD, Tringe SG, et al. 2015.** Salicylic acid modulates colonization of the root microbiome by specific bacterial taxa. *Science* **349**: 860–864.
- Lodge DJ, Wentworth TR. 1990.** Negative Associations among VA-Mycorrhizal Fungi and Some Ectomycorrhizal Fungi Inhabiting the Same Root System. *Oikos* **57**: 347.
- López-Ráez JA, Pozo MJ, García-Garrido JM. 2011.** Strigolactones: a cry for help in the rhizosphere. *Botany* **89**: 513–522.
- Lukešová T, Kohout P, Větrovský T, Vohník M. 2015.** The Potential of Dark Septate Endophytes to Form Root Symbioses with Ectomycorrhizal and Ericoid Mycorrhizal Middle European Forest Plants (R Balestrini, Ed.). *PLOS ONE* **10**: e0124752.
- Martin FM, Uroz S, Barker DG. 2017.** Ancestral alliances: Plant mutualistic symbioses with fungi and bacteria. *Science* **356**: eaad4501.
- Nguyen C. 2009.** Rhizodeposition of Organic C by Plant: Mechanisms and Controls. In: Lichtfouse E, Navarrete M, Debaeke P, Véronique S, Alberola C, eds. Sustainable Agriculture. Dordrecht: Springer Netherlands, 97–123.
- Philippot L, Raaijmakers JM, Lemanceau P, van der Putten WH. 2013.** Going back to the roots: the microbial ecology of the rhizosphere. *Nature Reviews Microbiology* **11**: 789–799.
- Plett JM, Daguerre Y, Wittulsky S, Vayssières A, Deveau A, Melton SJ, Kohler A, Morrell-Falvey JL, Brun A, Veneault-Fourrey C, et al. 2014a.** Effector MiSSP7 of the mutualistic fungus *Laccaria bicolor* stabilizes the *Populus* JAZ6 protein and represses jasmonic acid (JA) responsive genes. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **111**: 8299–8304.
- Plett JM, Kemppainen M, Kale SD, Kohler A, Legué V, Brun A, Tyler BM, Pardo AG, Martin F. 2011.** A Secreted Effector Protein of *Laccaria bicolor* Is Required for Symbiosis Development. *Current Biology* **21**: 1197–1203.
- Plett JM, Khachane A, Ouassou M, Sundberg B, Kohler A, Martin F. 2014b.** Ethylene and jasmonic acid act as negative modulators during mutualistic symbiosis between *Laccaria bicolor* and *Populus* roots. *New Phytologist* **202**: 270–286.
- Puga-Freitas R, Blouin M. 2015.** A review of the effects of soil organisms on plant hormone signalling pathways. *Environmental and Experimental Botany* **114**: 104–116.
- Riedel T, Groten K, Baldwin IT. 2008.** Symbiosis between *Nicotiana attenuata* and *Glomus intraradices*: ethylene plays a role, jasmonic acid does not. *Plant, Cell & Environment* **31**: 1203–1213.
- Robert-Seilaniantz A, Grant M, Jones JDG. 2011.** Hormone Crosstalk in Plant Disease and Defense: More Than Just JASMONATE-SALICYLATE Antagonism. *Annual Review of Phytopathology* **49**: 317–343.
- Schlaeppli K, Bulgarelli D. 2015.** The Plant Microbiome at Work. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **28**: 212–217.
- Shakya M, Gottel N, Castro H, Yang ZK, Gunter L, Labbé J, Muchero W, Bonito G, Vilgalys R, Tuskan G, et al. 2013.** A Multifactor Analysis of Fungal and Bacterial Community

Structure in the Root Microbiome of Mature *Populus deltoides* Trees (V Shah, Ed.). *PLoS ONE* **8**: e76382.

Strullu-Derrien C, Kenrick P, Pressel S, Duckett JG, Rioult J-P, Strullu D-G. 2014. Fungal associations in *Horneophyton ligneri* from the Rhynie Chert (c. 407 million year old) closely resemble those in extant lower land plants: novel insights into ancestral plant-fungus symbioses. *New Phytologist* **203**: 964–979.

Uroz S, Oger P, Tisserand E, Cébron A, Turpault M-P, Buée M, De Boer W, Leveau JHJ, Frey-Klett P. 2016. Specific impacts of beech and Norway spruce on the structure and diversity of the rhizosphere and soil microbial communities. *Scientific Reports* **6**.

Vierheilig H, Schweiger P, Brundrett M. 2005. An overview of methods for the detection and observation of arbuscular mycorrhizal fungi in roots+. *Physiologia Plantarum* **0**: 051021083431001-???

Wang B, Yeun LH, Xue J-Y, Liu Y, Ané J-M, Qiu Y-L. 2010. Presence of three mycorrhizal genes in the common ancestor of land plants suggests a key role of mycorrhizas in the colonization of land by plants. *New Phytologist* **186**: 514–525.

ANNEXE I : Milieux de Cultures

Tableau 1 : Composition du milieu de culture Murashige and Skoog

	Composition	Concentration
Milieu Murashige and Skoog (MS)	Macroéléments	50 ml.L-1
	Microéléments	100 ml.L-1
	Glucose	1 g.L-1
	MES	1 g.L-1
	Vitamine 100X (ajout après autoclave)	10 ml.L-1
	Vitamines Gamborgs (ajout après autoclave)	1 ml.L-1
	IBA (ajout après autoclave)	2 ml.L-1
	Agar	10 g.L-1

Ajuster à pH 5.8, ajouter l'agar puis autoclaver

Tableau 2 : Composition du milieu de culture Yoshida

	Composition	Concentration
Milieu Yoshida	Macroéléments	100 ml.L-1
	Microéléments	100 ml.L-1
	Sucrose (ajout après autoclave)	30 g.L-1
	MES	0.25 g.L-1
	Myo-inositol	0.1g.L-1
	Agar	7 g.L-1

Ajuster à pH 5.8, ajouter l'agar puis autoclaver

Tableau 3 : Composition du milieu de culture Yoshida co-culture

	Composition	Concentration
Milieu Yoshida co-culture	Macroéléments	100 ml.L-1
	Microéléments	100 ml.L-1
	Sucrose (ajout après autoclave)	30 g.L-1
	MES	0.25 g.L-1
	Myo-inositol	0.1g.L-1
	Agar	7 g.L-1
	Acetosyringone 0.5 µM	200 µ.L-1

Ajuster à pH 5.8, ajouter l'agar puis autoclaver

Tableau 4 : Composition du milieu de culture Yoshida antibiotique

	Composition	Concentration
Milieu Yoshida antibiotique	Macroéléments	100 ml.L-1
	Microéléments	100 ml.L-1
	Sucrose (ajout après autoclave)	30 g.L-1
	MES	0.25 g.L-1
	Myo-inositol	0.1g.L-1
	Agar	7 g.L-1
	Cefotaxime (200 mg.ml-1) (ajout après autoclave)	2.5 ml.L-1
	Carbamycine (200 mg.ml-1) (ajout après autoclave)	2.5 ml.L-1

Ajuster à pH 5.8, ajouter l'agar puis autoclaver

Tableau 5 : Composition du milieu de culture Yoshida selection

	Composition	Concentration
Milieu Yoshida selection	Macroéléments	100 ml.L-1
	Microéléments	100 ml.L-1
	Sucrose (ajout après autoclave)	30 g.L-1
	MES	0.25 g.L-1
	Myo-inositol	0.1g.L-1
	Agar	7 g.L-1
	Cefotaxime (200 mg.ml-1) (ajout après autoclave)	2.5 ml.L-1
	Carbamycine (200 mg.ml-1) (ajout après autoclave)	2.5 ml.L-1
Kanamycine (ajout après autoclave)	10 µg.ml-1	

Ajuster à pH 5.8, ajouter l'agar puis autoclaver

Tableau 6 : Composition du milieu de culture Yoshida selection + TDZ

	Composition	Concentration
Milieu Yoshida selection + TDZ	Macroéléments	100 ml.L-1
	Microéléments	100 ml.L-1
	Sucrose (ajout après autoclave)	30 g.L-1
	MES	0.25 g.L-1
	Myo-inositol	0.1g.L-1
	Agar	7 g.L-1
	Cefotaxime (200 mg.ml-1) (ajout après autoclave)	2.5 ml.L-1
	Carbamycine (200 mg.ml-1) (ajout après autoclave)	2.5 ml.L-1
	Kanamycine (ajout après autoclave)	10 µg.ml-1
	TDZ (ajout après autoclave)	0,25 µM

Ajuster à pH 5.8, ajouter l'agar puis autoclaver

ANNEXE II : Gènes Candidats et Programmes PCR

Tableau 1 : Liste des gènes candidats impliqués dans les voies de production et de signalisation hormonales.

Poplar_ID	Nom	Voie Hormonale	Fonction	Longueur CDS
Pt002G191900	PtGibOx.G1919	Acide Gibbérellique	Gibberellin 2-oxidase	996 bp
Pt019G036100	PtAP2.G0361	Ethylène	Related to AP2 11	828 bp
Pt014G002400	PtTerpCyc.G0024	Terpènes	Terpenoid cyclase	2289 bp
Pt010G110700	PtDELLA.G1107	Acide Gibbérellique	GRAS family TF (GAI)	1809 bp
Pt008G131700	PtDELLA.G1317	Acide Gibbérellique	GRAS family TF (GAI)	1803 bp
Pt004G089800	PtDELLA.G0898	Acide Gibbérellique	GRAS family TF (RGL)	1824 bp
Pt017G125200	PtDELLA.G1252	Acide Gibbérellique	GRAS family TF (RGL)	1860 bp
Pt006G148100	PtNPR1.G1481	Acide Salicylique	NPR1	1770 bp
Pt015G117200	PtNPR1-like.G1172	Acide Salicylique	NPR1-like	1785 bp
Pt012G118500	PtNPR1-like.G1185	Acide Salicylique	NPR1-like	1764 bp
Pt012G118300	PtNPR1-like.G1183	Acide Salicylique	NPR1-like	1437bp

Tableau 2 : Listes des amorces attB et des programmes PCR correspondant aux amplifications PCR permettant la création des constructions attB. Les amorces sont constituées des deux parties fixes suivantes ; bleu : 4 guanines, rouge ou vert : site attB1 ou attB2 respectivement, et d'une troisième partie variable (orange) correspondant à 15 nucléotides de la séquence d'intérêt.

Type d'Expression	Nom de Lignée	Amorces	Amplicon Size (bp)	Programme PCR	Cycles	Etape	Temperature (°C)	Temps	
Surexpression	PtGibOx.G1919	FF 1 GGGG ACAAGTTTGTACAAAAAGCAGGCT ATGGTAGTCTCTCCCACTCCAG FF 2 GGGG ACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGT TCAAGAAACAAATTTTCTGTGGCA	1104 bp	Programme A	35 cycles	Dénaturation Initiale	94	5 minutes	
	PtAP2.G0361	FF 3 GGGG ACAAGTTTGTACAAAAAGCAGGCT ATGGAATTCATTTCCAGCAAGAAA FF 4 GGGG ACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGT TTAGTGTGGAAATCCCAATAAA	936 bp			Dénaturation	94	30 s	
		PnPR1-like.G1183	FF 21 GGGG ACAAGTTTGTACAAAAAGCAGGCT ATGATGAATTTTACCTATGGAA FF 22 GGGG ACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGT TCATAGTTTTCTGAGCTGTACCA			1545 bp	Elongation	72	1'30 min
							Extension finale	72	7 minutes
				Conservation	4	∞			
		FF_17 GGGG ACAAGTTTGTACAAAAAGCAGGCT ATGGCTAATTTCTGAGCCATCGT		Programme B	35 cycles	Dénaturation Initiale	94	5 minutes	
	PnPR1-like.G1172					Dénaturation	94	30 s	
			FF_18 GGGG ACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGT TCATATTTTCTGAGTTGTACTA			1893 bp	Hybridation	50	30 s
					Extension finale	72	2 min		
					Conservation	4	7 minutes		
							∞		
Surexpression	PtTerpOyc.G0024	FF 5 GGGG ACAAGTTTGTACAAAAAGCAGGCT ATGTGGAGGCTAAGATTGCGAAG FF 6 GGGG ACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGT TCACCTGGATGTTGAAGCGAACGGA	2397 bp			Dénaturation Initiale	94	5 minutes	
	PtdELLA.G1107	FF 7 GGGG ACAAGTTTGTACAAAAAGCAGGCT ATGAAAAGAACACTCAAAATCC FF 8 GGGG ACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGT TTAAGCAGCCCTACTGGTGG	1917 bp			Dénaturation	94	30 s	
		PtdELLA.G1317	FF 9 GGGG ACAAGTTTGTACAAAAAGCAGGCT ATGAAAAGAACACTCAAAATCC FF 10 GGGG ACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGT CTAAGCAGCACCACCTACCGGTTGG			1911 bp			
	PtdELLA.G0898		FF 11 GGGG ACAAGTTTGTACAAAAAGCAGGCT ATGAAAGAGATCATCAAGAAACCA FF 12 GGGG ACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGT TCATTTGTGATTAATCACCAGCGGGG			1932 bp	Hybridation	55	30 s
		PtdELLA.G1252	FF 13 GGGG ACAAGTTTGTACAAAAAGCAGGCT ATGAAGAGATCATCAAGAAACCA FF 14 GGGG ACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGT TCATTTGACTGGTAGCTCGAACTCA	1978 bp					
	PnPR1.G1481		FF 15 GGGG ACAAGTTTGTACAAAAAGCAGGCT ATGGATAATAGGATGGTTTTCTGTG FF 16 GGGG ACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGT CTAATGACCACCACCATGCAATA	1878 bp	Extension finale	72	2'15 min		
		PnPR1-like.G1185	FF 19 GGGG ACAAGTTTGTACAAAAAGCAGGCT ATGGCTAATTTCTGAGCTATCAT FF 20 GGGG ACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGT TCATAGTTTTCTGAGCTGTACCA	1872 bp	Conservation	4	7 minutes		
								∞	
	ARN Interférence	PtGibOx.G1919i	FF 23 GGGG ACAAGTTTGTACAAAAAGCAGGCT ATGGCTGGGACCCTCACTAAAA FF 24 GGGG ACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGT GCTTGGATTTTGTGGCAAGCAGCG	388 bp			Dénaturation Initiale	94	5 minutes
		PtTerpOyc.G0024i	FF 25 GGGG ACAAGTTTGTACAAAAAGCAGGCT GTATTCTGTGAGCATGGCAGGG FF 26 GGGG ACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGT AAAAGTAGAAGAGGAGCCAAAATTC	379 bp			Dénaturation	94	30 s
PtdELLA.G1107i			FF 27 GGGG ACAAGTTTGTACAAAAAGCAGGCT CCAATCACCATTGCGATCTGTG FF 28 GGGG ACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGT AAGAAACCGAGAGTTGTGGAGGAC	331 bp			Hybridation	55	30 s
		PtdELLA.G0898i	FF 29 GGGG ACAAGTTTGTACAAAAAGCAGGCT AATCTACTTACTGATCTGATT FF 30 GGGG ACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGT AACTCCATTTGTCGGAGATGAA	382 bp			Elongation	72	30 s
PnPR1.G1481i			FF 31 GGGG ACAAGTTTGTACAAAAAGCAGGCT TCGAATGAAGGAATGGCTAAGGA FF 32 GGGG ACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGT CTCACAAGCTTCCACCATATGTTT	375 bp	Extension finale	72	7 minutes		
					Conservation	4	∞		

Tableau 3 : Listes des amorces et des programmes PCR correspondant aux amplifications PCR réalisées sur colonies bactériennes après recombinaison BP.

Amorces et Programmes PCR (Recombinaison BP)											
Type d'Expression	Nom de Lignée	Amorces M13 F-M13 R	Tm (°C)	Amplicon Size (bp)	Programme PCR	Cycles	Etape	Temperature (°C)	Temps		
Surexpression	PtGibOx.G1919	M13_Forward GTAAAACGACGGCCAGT	53.9	1304 bp	Programme A	35 cycles	Dénaturation Initiale	94	5 minutes		
		M13_Reverse GTCATAGCTGTTTCCTG	47.8				Dénaturation	94	30 s		
	PtAP2.G0361	M13_Forward GTAAAACGACGGCCAGT	53.9	1136 bp			Hybridation	55	30 s		
		M13_Reverse GTCATAGCTGTTTCCTG	47.8				Elongation	72	1'30 min		
	PtNPR1-like.G1172	M13_Forward GTAAAACGACGGCCAGT	53.9	2093 bp			Extension finale	72	7 minutes		
		M13_Reverse GTCATAGCTGTTTCCTG	47.8				Conservation	4	∞		
	PtDELLA.G1107	M13_Forward GTAAAACGACGGCCAGT	53.9	2117 bp	Programme C	35 cycles	Dénaturation Initiale	94	5 minutes		
		M13_Reverse GTCATAGCTGTTTCCTG	47.8				Dénaturation	94	30 s		
	PtDELLA.G1317	M13_Forward GTAAAACGACGGCCAGT	53.9	2111 bp			Hybridation	55	30 s		
		M13_Reverse GTCATAGCTGTTTCCTG	47.8				Elongation	72	2'15 min		
	PtNPR1.G1481	M13_Forward GTAAAACGACGGCCAGT	53.9	2078 bp			Extension finale	72	7 minutes		
		M13_Reverse GTCATAGCTGTTTCCTG	47.8				Conservation	4	∞		
ARN Interférence	PtGibOx.G1919i	M13_Forward GTAAAACGACGGCCAGT	53.9	621 bp	Programme D	35 cycles	Dénaturation Initiale	94	5 minutes		
		M13_Reverse GTCATAGCTGTTTCCTG	47.8				Dénaturation	94	30 s		
	PtTerpCyc.G0024i	M13_Forward GTAAAACGACGGCCAGT	53.9	612 bp			Hybridation	55	30 s		
		M13_Reverse GTCATAGCTGTTTCCTG	47.8				Elongation	72	30 s		
	PtDELLA.G1107i	M13_Forward GTAAAACGACGGCCAGT	53.9	564 bp			Extension finale	72	7 minutes		
		M13_Reverse GTCATAGCTGTTTCCTG	47.8				Conservation	4	∞		
	PtDELLA.G0898i	M13_Forward GTAAAACGACGGCCAGT	53.9	615 bp			Programme D	35 cycles	Dénaturation Initiale	94	5 minutes
		M13_Reverse GTCATAGCTGTTTCCTG	47.8						Dénaturation	94	30 s
PtNPR1.G1481i	M13_Forward GTAAAACGACGGCCAGT	53.9	608 bp	Hybridation	55	30 s					
	M13_Reverse GTCATAGCTGTTTCCTG	47.8		Elongation	72	30 s					
PtNPR1.G1481i	M13_Forward GTAAAACGACGGCCAGT	53.9	608 bp	Extension finale	72	7 minutes					
	M13_Reverse GTCATAGCTGTTTCCTG	47.8		Conservation	4	∞					

Tableau 4 : Listes des amorces et des programmes PCR correspondant aux amplifications PCR réalisées sur colonies bactériennes après recombinaison LR sur les lignées de surexpression.

Amorces et Programmes PCR (Recombinaison LR)									
Type d'Expression	Nom de Lignée	Amorces VB007-VB006	Tm (°C)	Amplicon Size (bp)	Programme PCR	Cycles	Etape	Temperature (°C)	Temps
Surexpression	PtDELLA.G1107	VB007_Forward ACTATTCTAGTCGACCTGCAGG	57.2	2082 bp	Programme B	35 cycles	Dénaturation Initiale	94	5 minutes
		VB006_Reverse CTTATATGCTCAACACATGAGCG	54.9				Dénaturation	94	30 s
	PtDELLA.G1317	VB007_Forward ACTATTCTAGTCGACCTGCAGG	57.2	2076 bp			Hybridation	55	30 s
		VB006_Reverse CTTATATGCTCAACACATGAGCG	54.9				Elongation	72	2 min
	PtNPR1.G1481	VB007_Forward ACTATTCTAGTCGACCTGCAGG	57.2	2043 bp			Extension finale	72	7 minutes
		VB006_Reverse CTTATATGCTCAACACATGAGCG	54.9				Conservation	4	∞
	PtNPR1-like.G1172	VB007_Forward ACTATTCTAGTCGACCTGCAGG	57.2	1893 bp	Programme A	35 cycles	Dénaturation Initiale	94	5 minutes
		VB006_Reverse CTTATATGCTCAACACATGAGCG	54.9				Dénaturation	94	30 s
	PtAP2.G0361	VB007_Forward ACTATTCTAGTCGACCTGCAGG	57.2	1101 bp			Hybridation	55	30 s
		VB006_Reverse CTTATATGCTCAACACATGAGCG	54.9				Elongation	72	1'30 min
	PtGibOx.G1919	VB007_Forward ACTATTCTAGTCGACCTGCAGG	57.2	1266 bp			Extension finale	72	7 minutes
		VB006_Reverse CTTATATGCTCAACACATGAGCG	54.9				Conservation	4	∞

Tableau 5 : Listes des amorces et des programmes PCR correspondant aux amplifications PCR réalisées sur colonies bactériennes après recombinaison LR sur les lignées d'interférence à ARN.

Amorces et Programmes PCR (Recombinaison LR)									
Type d'Expression	Nom de Lignée	Amorces VB007-VB006	Tm (°C)	Amplicon Size (bp)	Programme PCR	Cycles	Étape	Température (°C)	Temps
ARN Interférence	PtDELLA.G1107i	VB007_Forward ACTATTCTAGTCGACCTGCAGG VB006_Reverse CTTATATGCTCAACACATGAGCG	57.2 54.9	2273 bp	Programme E	35 cycles	Dénaturation Initiale	94	5 minutes
	PtDELLA.G0898i	VB007_Forward ACTATTCTAGTCGACCTGCAGG VB006_Reverse CTTATATGCTCAACACATGAGCG	57.2 54.9	2375 bp			Dénaturation	94	30 s
	PtNPR1.G1481i	VB007_Forward ACTATTCTAGTCGACCTGCAGG VB006_Reverse CTTATATGCTCAACACATGAGCG	57.2 54.9	2361 bp			Hybridation	55	30 s
	PtGibOx.G1919i	VB007_Forward ACTATTCTAGTCGACCTGCAGG VB006_Reverse CTTATATGCTCAACACATGAGCG	57.2 54.9	2365 bp			Elongation	72	2'30 min
	PtTerpCyc.G0024i	VB007_Forward ACTATTCTAGTCGACCTGCAGG VB006_Reverse CTTATATGCTCAACACATGAGCG	57.2 54.9	2369 bp			Extension finale	72	7 minutes
							Conservation	4	∞
Type d'Expression	Nom de Lignée	Amorces CmR_F-VB007	Tm (°C)	Amplicon Size (bp)	Programme PCR	Cycles	Étape	Température (°C)	Temps
ARN Interférence	PtDELLA.G1107i	CmR_F ACAACAGTACTGCGATGAGTG VB007_Forward ACTATTCTAGTCGACCTGCAGG	55.8 57.2	801 bp	Programme F	35 cycles	Dénaturation Initiale	94	5 minutes
	PtDELLA.G0898i	CmR_F ACAACAGTACTGCGATGAGTG VB007_Forward ACTATTCTAGTCGACCTGCAGG	55.8 57.2	852 bp			Dénaturation	94	30 s
	PtNPR1.G1481i	CmR_F ACAACAGTACTGCGATGAGTG VB007_Forward ACTATTCTAGTCGACCTGCAGG	55.8 57.2	845 bp			Hybridation	55	30 s
	PtGibOx.G1919i	CmR_F ACAACAGTACTGCGATGAGTG VB007_Forward ACTATTCTAGTCGACCTGCAGG	55.8 57.2	858 bp			Elongation	72	1 min
	PtTerpCyc.G0024i	CmR_F ACAACAGTACTGCGATGAGTG VB007_Forward ACTATTCTAGTCGACCTGCAGG	55.8 57.2	849 bp			Extension finale	72	7 minutes
							Conservation	4	∞
Type d'Expression	Nom de Lignée	Amorces CmR_R-VB006	Tm (°C)	Amplicon Size (bp)	Programme PCR	Cycles	Étape	Température (°C)	Temps
ARN Interférence	PtDELLA.G1107i	CmR_R GGCCGTAATATCCAGCTGAAC VB006_Reverse CTTATATGCTCAACACATGAGCG	57.7 54.9	978 bp	Programme G	35 cycles	Dénaturation Initiale	94	5 minutes
	PtDELLA.G0898i	CmR_R GGCCGTAATATCCAGCTGAAC VB006_Reverse CTTATATGCTCAACACATGAGCG	57.7 54.9	1029 bp			Dénaturation	94	30 s
	PtNPR1.G1481i	CmR_R GGCCGTAATATCCAGCTGAAC VB006_Reverse CTTATATGCTCAACACATGAGCG	57.7 54.9	1022 bp			Hybridation	55	30 s
	PtGibOx.G1919i	CmR_R GGCCGTAATATCCAGCTGAAC VB006_Reverse CTTATATGCTCAACACATGAGCG	57.7 54.9	1035 bp			Elongation	72	1'15 min
	PtTerpCyc.G0024i	CmR_R GGCCGTAATATCCAGCTGAAC VB006_Reverse CTTATATGCTCAACACATGAGCG	57.7 54.9	1026 bp			Extension finale	72	7 minutes
							Conservation	4	∞

Tableau 6 : Bilan des lignées transgéniques générées. A partir de 11 gènes candidats, nous avons obtenu 4 lignées transgéniques de surexpression (PtGibOx.G1919, PtDELLA.G1107, PtDELLA.G1317 et PtNPR1.G1481) et 3 lignées de répression (PtGibOx.G1919i, PtDELLA.G1107i, PtNPR1.G1481i). En gris foncé : lignées transgéniques de peupliers transformés. En gris clair : clones d'*A. rhizogenes* (ARqua4) prêts pour l'expression transgénique chez le peuplier.

Lignées Transgéniques Générées				
Type d'Expression	Poplar_ID	Nom de Lignée	Voie Hormonale	Fonction
Surexpression	Pt019G036100	PtAP2.G0361	Ethylène	Related to AP2 11
	Pt002G191900	PtGibOx.G1919	Acide Gibbérellique	Gibberellin 2-oxidase
	Pt010G110700	PtDELLA.G1107	Acide Gibbérellique	GRAS family TF (GAI)
	Pt008G131700	PtDELLA.G1317	Acide Gibbérellique	GRAS family TF (GAI)
	Pt006G148100	PtNPR1.G1481	Acide Salicylique	NPR1
	Pt015G117200	PtNPR1-like.G1172	Acide Salicylique	NPR1-like
ARN Interférence	Pt014G002400	PtTerpCyc.G0024i	Terpènes	Terpenoid cyclase
	Pt002G191900	PtGibOx.G1919i	Acide Gibbérellique	Gibberellin 2-oxidase
	Pt010G110700	PtDELLA.G1107i	Acide Gibbérellique	GRAS family TF (GAI)
	Pt004G089800	PtDELLA.G0898i	Acide Gibbérellique	GRAS family TF (RGL)
	Pt006G148100	PtNPR1.G1481i	Acide Salicylique	NPR1

ANNEXE III : Cartes Génétiques des Plasmides Donneurs et Destinataires

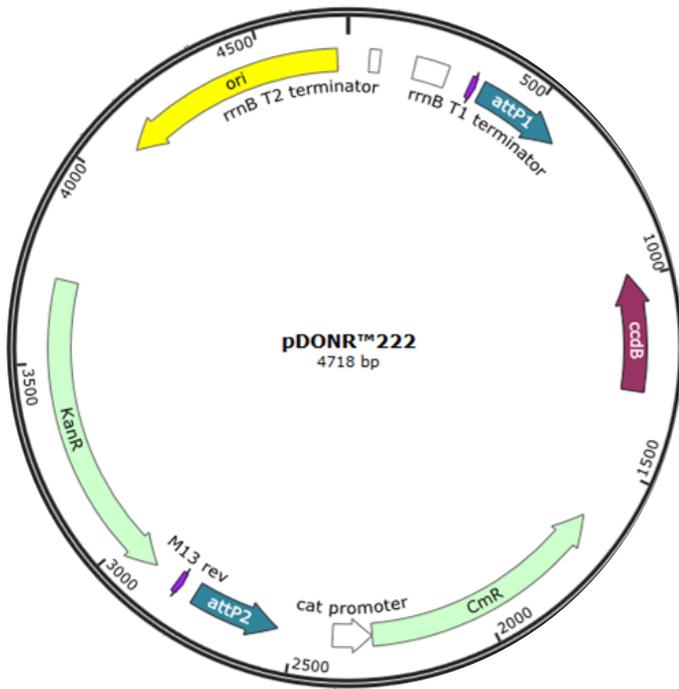


Figure 1 : Plasmide d'entrée pDONR 222 permettant la recombinaison BP chez les lignées de surexpression et d'interférence ARN. ccdB : toxine létale, CmR : Résistance Chloramphénicol, KanR : Résistance Kanamycine, attP1/2 : site de recombinaison BP. Adapté de <http://www.snapgene.com>

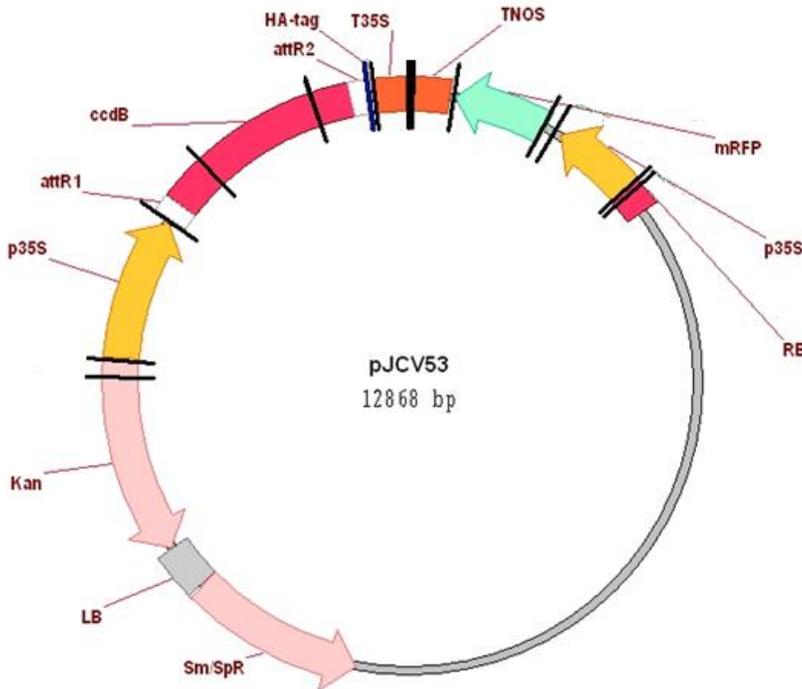


Figure 2 : Plasmide destinataire pJCV53 permettant la recombinaison LR chez les lignées transgéniques de surexpression. ccdB : toxine létale, KanR : Résistance Kanamycine, attR1/2 : site de recombinaison LR, SpR : Résistance Spectinomycine, mRFP : marqueur fluorescent. Adapté de <https://gateway.psb.ugent.be/vector/show/pJCV53>

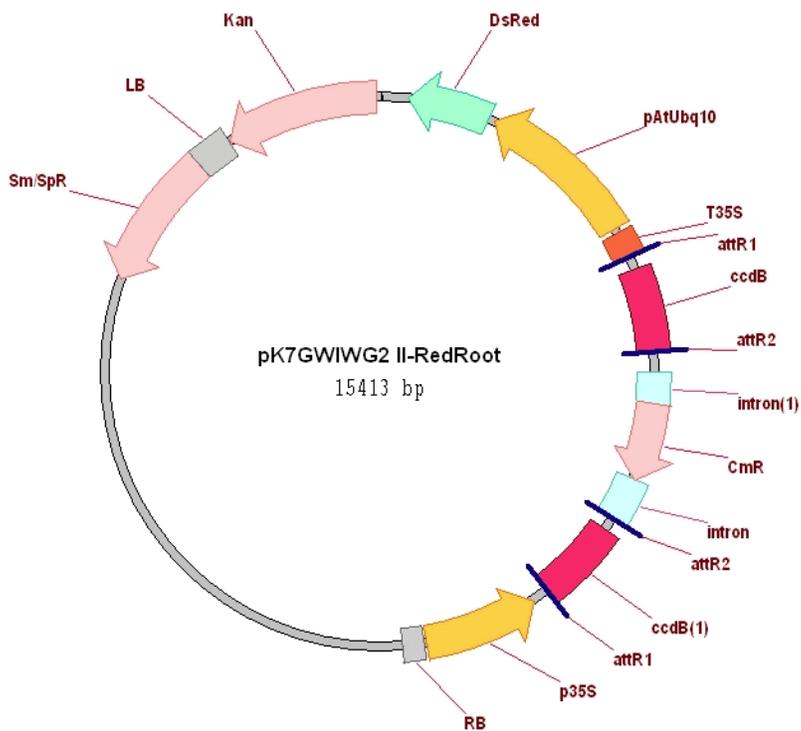


Figure 3 : Plasmide destinataire pK7GWIWG2 II (RedRoot) permettant la recombinaison LR chez les lignées transgéniques de répression. ccdB : toxine létale, CmR : Résistance Chloramphénicol, KanR : Résistance Kanamycine, attR1/2 : site de recombinaison LR, SpR : Résistance Spectinomycine, DsRed : marqueur fluorescent. Adapté de https://gateway.psb.ugent.be/vector/show/pK7GWIWG2_II-RedRoot