



HAL
open science

Validation fonctionnelle du rôle des miARNs dans la tolérance au phénanthrène chez *Spartina*: Utilisation d'*Arabidopsis* en système hétérologue

Loup Tran van Canh

► **To cite this version:**

Loup Tran van Canh. Validation fonctionnelle du rôle des miARNs dans la tolérance au phénanthrène chez *Spartina*: Utilisation d'*Arabidopsis* en système hétérologue. Sciences du Vivant [q-bio]. 2018. dumas-01972430

HAL Id: dumas-01972430

<https://dumas.ccsd.cnrs.fr/dumas-01972430>

Submitted on 7 Jan 2019

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.

AGROCAMPUS OUEST

- CFR Angers
 CFR Rennes



UNIVERSITÉ DE
RENNES 1



<p>Année universitaire 2017-2018 Master Biologie, Agrosociétés Parcours Amélioration, Production, Valorisation du Végétal Option Physiologie Moléculaire et Adaptation aux Stress</p>	<p style="text-align: center;">Mémoire de fin d'études</p> <p><input type="checkbox"/> d'Ingénieur de l'Institut Supérieur des Sciences agronomiques, agroalimentaires, horticoles et du paysage</p> <p><input type="checkbox"/> de Master de l'Institut Supérieur des Sciences agronomiques, agroalimentaires, horticoles et du paysage</p> <p><input checked="" type="checkbox"/> d'un autre établissement (étudiant arrivé en M2)</p>
---	---

Validation fonctionnelle du rôle des miARNs dans la tolérance au phénoanthrène chez *Spartina* : Utilisation d'*Arabidopsis* en système hétérologue

Par Loup TRAN VAN CANH



Soutenu à Rennes le 28 juin 2018

Devant le jury composé de :

Président : Antoine GRAVOT

Maître de stage : Abdelhak EL AMRANI, Armel SALMON, Malika-Lily AÏNOUCHE

Enseignant référent : Alain BOUCHEREAU

Autres membres du jury :

Mathieu ROUSSEAU-GUEUTIN (Rapporteur)

Les analyses et les conclusions de ce travail d'étudiant n'engagent que la responsabilité de son auteur et non celle d'AGROCAMPUS OUEST

Ce document est soumis aux conditions d'utilisation

« Paternité-Pas d'Utilisation Commerciale-Pas de Modification 4.0 France »

disponible en ligne <http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/deed.fr>



Remerciements

Je remercie le Pr. Malika Aïnouche pour m'avoir accueilli au sein de l'équipe EGA de l'UMR ECOBIO.

Mes remerciements les plus sincères à :

Abdelhak El Amrani, Armel Salmon et Malika-Lily Aïnouche, pour m'avoir immédiatement accordé leur confiance ;

Abdelhak encore une fois, pour m'avoir initié à la manipulation, la culture, aux travers de l'arabette et si bien encadré, même avec 8 heures de jet-lag ;

Oscar Lima, pour m'avoir patiemment accompagné lors des premiers protocoles de Biologie Moléculaire ;

Armel et Oscar encore une fois, pour la mise au point du protocole de qPCR de miARN ;

Armand Cavé-Radet, pour toutes ces raisons (à 7h30 de jet-lag près), sa présence, son aide et aussi le centime que je lui dois toujours.

Et encore un fois merci à tous pour les corrections en flux tendu !

Je remercie bien évidemment Jean-Philippe Combier pour nous avoir gracieusement fourni les miPEPs, sans oublier une pensée pour tout le personnel de l'OSUR et d'ECOBIO que j'ai côtoyé au cours de ce stage.

SOMMAIRE

Introduction	1
Matériel et Méthodes.....	5
I) Confirmation des profils d'expression des miARNs chez <i>Spartina</i> par RT-qPCR	5
1) Synthèse des ADNc et normalisation des échantillons.....	5
2) Ajustement des paramètres et analyse des résultats.....	6
II) Validation fonctionnelle des miARNs <i>Spartina</i> par approche mutants T-DNA chez <i>Arabidopsis</i>	6
1) Criblage phénotypique primaire.....	7
2) Production de graines homozygotes.....	8
a) Culture des plantes	8
b) Echantillonnage et extraction d'ADN.....	8
c) Génotypage des individus en culture.....	9
3) Phénotypage des lignées mutantes homozygotes.....	10
III) Validation fonctionnelle des miARNs <i>Spartina</i> par approche miPEP.....	10
Résultats	11
I) Confirmation des profils d'expressions des miARNs obtenus par small-RNAseq	11
1) Validation des amorces des miARNs par PCR en point final.....	12
2) Ajustement des paramètres de RT-qPCR.....	12
3) Analyse des niveaux d'expression des miARNs.....	12
II) Etude de l'impact des mutations des miARNs d'intérêts sur la tolérance d'<i>Arabidopsis</i> au phénanthrène	14
1) Sélection des lignées T-DNA hypersensibles et tolérantes.....	15
2) Confirmation de l'insertion du T-DNA par PCR.....	15
3) Analyses phénotypiques des mutants homozygotes.....	15
III) Utilisation d'une nouvelle stratégie pour l'analyse fonctionnelle des miARNs	17
Discussion	18
Conclusion et Perspectives.....	22
Bibliographie	23

Abréviations

ARNm : ARN messenger

ARNlnc : ARN long non codant

DE : Différentiellement Exprimé

FC : Fold Change

GST : Glutathion-S-Transférase

HAP : Hydrocarbure Aromatique Polycyclique

MIR : gène codant un micro ARN

miARN : micro ARN

miPEP : Peptides codés par une séquence contenue dans les pre-miARNs

ORF : Open Reading Frame

PCR : Réactions de Polymérisation en Chaîne

RT-qPCR : PCR quantitative en Temps-Réel

POP : Polluant Organique Persistant

PHE : Phénanthrène

ROS : Espèce Réactive de l'Oxygène

SPL : *Squamosa* Promoter binding-Like protein

Introduction

La présence grandissante d'Hydrocarbures Aromatiques Polycycliques (HAPs) au sein de l'environnement soulève aujourd'hui de nombreuses questions sur leurs conséquences environnementales. L'activité humaine est la source principale de production des HAPs (**Haritash and Kaushik, 2009**), ils sont donc retrouvés plus concentrés dans l'atmosphère des villes ainsi que dans certains types de zones industrielles et/ou polluées (**Kästner et al., 2014**). Ils s'accumulent dans les organismes qui ne les dégradent pas et remontent donc les chaînes trophiques, soulevant des inquiétudes à la fois d'ordres écologique et de santé publique (**Grova, 2003 ; Vandermeersch et al., 2017**). L'impact des HAPs sur l'environnement est particulièrement prononcé dans les régions proches des raffineries et lors des marées noires, puisque ces constituants du pétrole brut se retrouvent déversés en très grandes quantités dans l'environnement.

Les HAPs sont composés d'atomes de carbone et d'hydrogène formant plusieurs cycles, ils sont hydrophobes et classés selon leurs poids moléculaires et la structure de leurs cycles aromatiques. Le phénanthrène (PHE) ($C_{14}H_{10}$) est un HAP alternant de faible poids moléculaire composé de 3 noyaux benzéniques utilisé comme modèle d'étude de cette famille d'hydrocarbures (**Mrozik et al., 2003**). Ces xénobiotiques sont issus de phénomènes de pyrolyse incomplète et sont classifiés comme polluants organiques persistants (POPs). Certaines molécules sont particulièrement toxiques, mutagènes et/ou carcinogènes, en particulier par le biais des époxydes produits par leurs réactions avec les lipides (**Samanta et al., 2002 ; Mrozik et al., 2003**).

Comprendre les mécanismes de tolérance au PHE chez les plantes pourrait à terme permettre d'améliorer la capacité de bioaccumulation des HAPs par les plantes et aboutir à la mise au point d'outils de phytoremédiation efficaces dans une perspective de dépollution.

Les effets du PHE sur la plante modèle *Arabidopsis thaliana* se manifestent par une réduction de la croissance racinaire et une accumulation dans les tissus foliaires, particulièrement autour des trichomes et des stomates des feuilles sénescents (**Dumas et al., 2016**). Par sa structure proche de certaines phytohormones, la molécule interférerait avec les voies de signalisation hormonales des stress abiotiques et biotiques, avec des effets de rétrocontrôles sur la production de ROS (« Reactive Oxygen Species » ; **Weisman et al., 2010**). La structure des trichomes est souvent affectée sous l'effet du stress oxydatif, stress que le PHE et ses produits de réactions provoquent chez plusieurs espèces de plantes (**Alkio et al., 2005 ;**

Dumas et al., 2016). L'activité particulièrement importante des Glutathion-S-Transférases (GSTs) dans ces structures où s'accumule le PHE pourrait être due à une activité de détoxification des ROS. Les activités enzymatiques de détoxification des ROS de nombreuses espèces sont d'ailleurs impactées positivement en présence modérées d'HAPs. Il semblerait que les halophytes possèdent des facultés de tolérance supérieures aux autres plantes (**Shiri et al., 2015**). La détoxification effective des xénobiotiques par les plantes (et les animaux) après leur absorption repose sur les étapes successives de (1) transformation, (2) conjugaison et (3) compartimentation (**Edwards et al., 2011**). Jusqu'à présent, aucune étude n'est parvenue à déterminer les réactions propres au PHE qui détermine sa toxicité.

Lors de la marée noire dans le Golfe du Mexique consécutive à l'explosion de la plateforme pétrolière « Deepwater Horizon », un suivi de la résilience de la large étendue impactée (1 800 km de côtes) a permis de montrer que la structure de la végétation avait été profondément modifiée, dégradant les taux de sédimentation et augmentant les taux d'érosion verticale des sols (**Lin et al., 2016**). Parmi les zones modérément touchées, les marais salés de la côte dominés par *Spartina alterniflora* et *Juncus roemerianus* ont retrouvés les niveaux de biomasse pré-marée noire dans les 24-30 mois qui ont suivi, alors que dans les zones hautement polluées seules les populations de *S. alterniflora* ont montré une résilience de 50% dans les 42 mois suivant la marée noire. Cette résilience accompagne la recolonisation des marais par les microalgues benthiques et la meiofaune des marais touchés (**Fleeger et al., 2015**). La tolérance de cette espèce face à un tel stress aux hydrocarbures suscite depuis un intérêt particulier dans la perspective de protection des zones intertidales et de phytoremédiation des sols pollués.

Les spartines sont des Poacées de type C4 de la sous-famille des Chloridoideae. Halophytes facultatives, elles sont adaptées à de nombreux milieux et sont toutes polyploïdes (**Aïnouche et al. 2012**). Dans le contexte de communautés biologiques dégradées elles peuvent s'avérer envahissantes et avoir des impacts négatifs, comme par exemple en Chine, sur les berges de la rivière Yangtze (**Zhang et al. 2004**). Au contraire, elles peuvent aussi être des espèces fondatrices permettant l'instauration de nouvelles communautés dans les écosystèmes fortement dégradés par la pollution, et par exemple empêcher l'érosion des littoraux, voire même de les restaurer (**Strong & Ayres, 2009 ; Pennings & Bertness, 2001 ; Fleeger et al., 2015**). L'espèce au cœur de cette étude, *Spartina anglica*, est une espèce allopolyploïde qui présente une tolérance au PHE supérieure à ses espèces parentales (**Cavé-Radet et al.**, soumis pour publication). C'est une allododécaploïde ($2n=12x=120-124$) apparue en 1890 dans la baie de Southampton suite au doublement chromosomique de l'hybride hexaploïde *S. x townsendii* ($2n=6x=62$), lui-même apparu 20 ans plus tôt dans cette baie (**Marchant, 1963**). Cet hybride

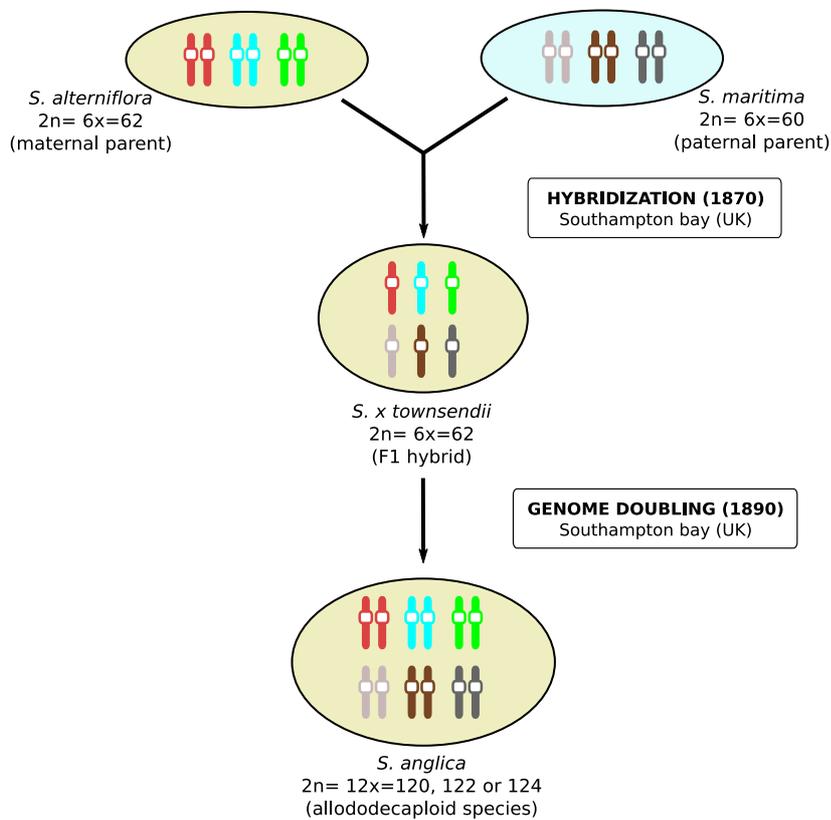


Figure 1 : Schéma de la formation de l'allopolyploïde *S. anglica* (Cavé-Radet, in prep).

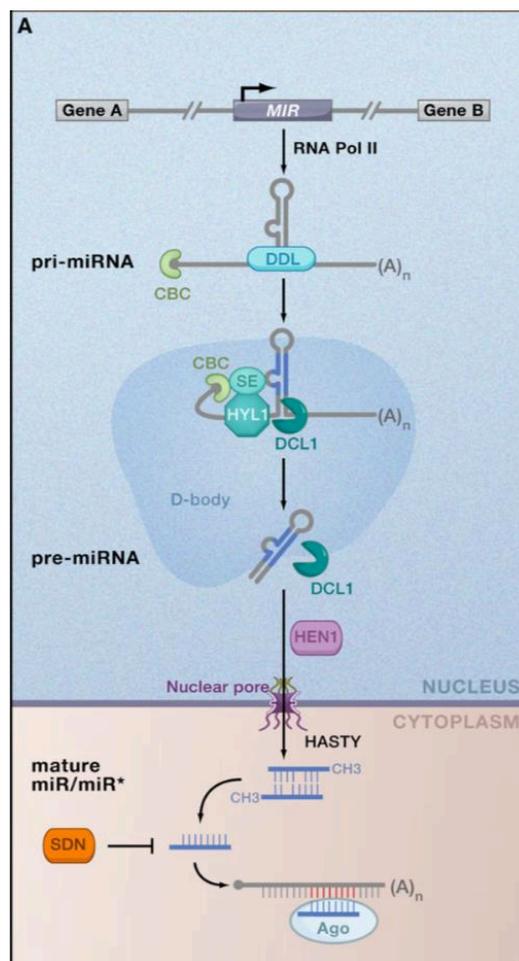


Figure 2 : Schema de la synthèse des miARNs (Voinnet et al., 2009).

stérile est issu du croisement entre les hexaploïdes *S. alterniflora* ($2n=6x=62$) et *S. maritima* ($2n=6x=60$) (voir **fig.1**) (**Aïnouche et al., 2009**). L'hybride stérile s'est maintenu par multiplication végétative et est aujourd'hui toujours présent sur son site d'origine (Baie de Southampton). La nouvelle espèce fertile *S. anglica*, particulièrement plastique (**Thompson et al., 1991**), a rapidement colonisé et envahi les marais salés Ouest-Européens puis des marais salés sur l'ensemble du globe par introduction naturelle ou anthropique (dans le but de stabiliser les zones côtières) au point d'être aujourd'hui considérée comme invasive à l'échelle mondiale. L'allopolyploïdisation entraîne une dynamique particulière du génome qui provoque le changement d'expression de nombreux gènes (**Wendel et al., 2016**). La réunion de deux génomes (issus d'espèces différentes) engendre un effet d'hétérosis, une caractéristique phénotypique récurrente des hybrides F1 (**Comai et al., 2005**) observable chez *S. x townsendii*. L'évènement d'allopolyploïdisation récent au sein du genre *Spartina* en fait un exemple particulièrement approprié à l'étude des impacts de la polyploïdisation sur les plantes, tant au niveau évolutif que génétique et physiologique (**Aïnouche et al., 2004**).

Les modifications des régulations post-transcriptionnelles par les petits ARNs peuvent améliorer la tolérance des plantes aux stress (**Katiyar-Agarwal et al., 2014**). Afin de mieux comprendre l'impact de la polyploïdie sur la tolérance au PHE, l'équipe d'accueil a réalisé le séquençage des petits ARNs et des ARNm (ARN messagers) des espèces parentales, de l'hybride F1 et du polyploïde (**Cavé-Radet et al., en préparation**). Suite à la mise en place d'un pipeline bio-informatique, des microARNs (miARNs) différentiellement exprimés (DE) entre 4 espèces de spartines (*S. alterniflora*, *S. maritima*, *S. x townsendii* et *S. anglica*) et entre conditions contrôle et de stress ont été identifiés. Les miARNs sont des régulateurs post-transcriptionnels, ils permettent d'adapter l'expression du génome au cours du développement et en conditions de stress. Les miARNs de plantes sont formés à partir des gènes *MIR* ; ceux-ci sont (en partie) formés de 2 séquences inversées-répétées transcrites par l'ARN polymérase II dans le noyau (**fig.2**). Le transcrit coiffé et polyadénylé forme le pri-miARN, dont la structure en forme de tête d'épingle caractéristique distingue le miARN des autres classes de petits ARNs. Le complexe formé des enzymes DCL1, HYL1 et SE excise le transcrit en pre-miARN, puis forme un duplex miARN/miARN*. Celui-ci est méthylé côté 3' par l'enzyme HUA et exporté dans le cytoplasme par HST1 et des protéines de transport. Le complexe RISC intègre alors un des 2 fragments qui guide alors le complexe vers la cible du miARN. Lorsque la cible est un transcrit complémentaire du brin miARN, celui-ci est un régulateur post-transcriptionnel, mais il peut aussi cibler des gènes et entraîner des modifications épigénétiques qui vont réguler son expression (**Carthew et al., 2009 ; Kraiwesh et al., 2012**).

L'analyse fonctionnelle *in situ* des miARNs DE dans les spartines est à l'heure actuelle impossible, à la fois par l'absence de mutants et par la grande difficulté d'éteindre l'expression des gènes dans un contexte de polyploïdie. La recherche de mutant correspondants n'a pas aboutie. En effet, chez *Brachypodium*, la plante modèle des monocotylédones, les collections de mutants sont peu fournies et ne se prêtent pas à un criblage rapide. Il a finalement été décidé d'utiliser *A. thaliana* comme système hétérologue pour réaliser l'analyse fonctionnelle des miARNs d'intérêts.

Seuls les miARNs conservés au sein des plantes et dont les séquences géniques sont relativement proches entre spartines et *A. thaliana* ont été retenus pour valider le rôle et l'impact de leur expression. Afin d'évaluer avec davantage de précision les implications des différents miARNs identifiés, les mutants de certains des gènes qu'ils ciblent ont également été phénotypés. Par ailleurs, il a récemment été découvert que les gènes codants les miARNs codaient des petits peptides appelés miPEPs, ces derniers étant impliqués dans l'induction spécifique de la transcription du miARN correspondant (voir **fig.3**) (**Laouressergues et al., 2015**). Ils sont codés par des séquences contenues dans l'ORF (Open Reading Frame) de la partie 3' des pri-miARNs, et permettent d'activer la transcription des gènes *MIR* d'intérêts par leur simple application sur les plantules en développement, et donc conduire à l'inhibition des gènes cibles par les miARNs néo-synthétisés (**Couzigou et al., 2015**). Cette découverte a été mise à profit pour cribler des miPEPs capables de modifier le phénotype dans des conditions de stress provoquées par le PHE.

Les objectifs de ce stage sont donc (1) de valider l'expression différentielle d'un sous-ensemble de miARNs chez les *Spartina* par RT-qPCR ; (2) de valider la fonction de ces miARNs par une approches mutants T-DNA en système hétérologue chez *A. thaliana* ; et (3) de tester leur induction par miPEPs.

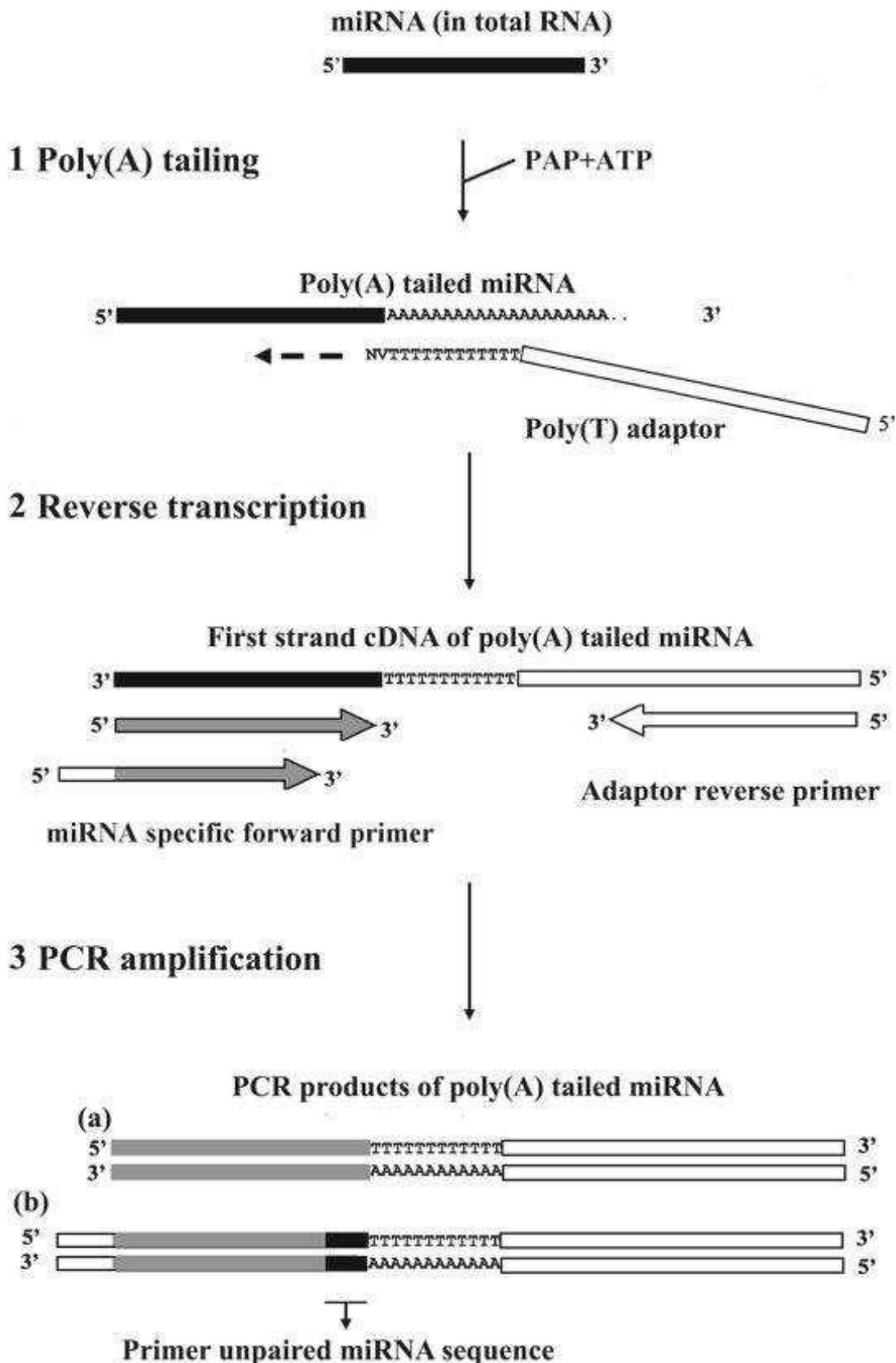


Figure 4 : Protocole d'amplification des miARNs par PCR (Shi et al., 2012).

Matériel et Méthodes

I) Confirmation des profils d'expression des miARNs chez *Spartina* par RT-qPCR

Le laboratoire d'accueil dispose de données d'expression des petits ARNs et ARNm en condition de stress au PHE ([PHE] substrat = 150mg/kg) et en conditions contrôlées (3 réplicats) pour 4 espèces de spartines : *S. alterniflora* ; *S. maritima* ; leur hybride *S. x townsendii* ; et l'allopolyploïde *S. anglica* qui résulte de la duplication du génome de *S. x townsendii*. Après 5 jours de traitement, les feuilles ont été collectées et immédiatement figées dans l'azote liquide. Les ARNs ont été extraits à l'aide de TRIzol® (Sigma -Aldrich) selon le protocole décrit par **Chelaifa et al.** (2010). Deux banques pour séquençage Illumina ont été réalisées : une banque pour séquencer les petits ARNs (sélection par la taille, HELIXIO) et une autre pour séquencer les messagers (réalisée à la Plateforme GEH OSUR, Biogenouest). Après analyse des données de séquençage de la banque de petits ARNs et la détection des miARNs potentiels (à l'aide la base de données de miARNs miRBase et d'outils de prédiction *in silico* de miARNs à l'aide de miR-PREFeR), une liste de miARNs identifiés comme différentiellement exprimés entre les différentes espèces étudiées et/ou en présence de PHE a été établie selon les méthodes EDASeq (Analyse Exploratoire et Normalisation de Données RNAseq) et DESeq2 (Analyse d'expression différentielle des gènes basée sur la loi binomiale négative) (**Risso et al., 2011 ; Love et al., 2014**).

1) Synthèse des ADNc et normalisation des échantillons

Afin de confirmer l'annotation et les profils d'expression des miARNs détectés chez *Spartina*, la validation de ces données a été effectuée par RT-qPCR (Real-Time quantitative PCR). Les RT-qPCR de miARNs différentiellement exprimés par séquençage haut-débit ont été réalisées à partir des mêmes ARNs extraits des échantillons utilisés pour suivre l'expression des miARNs et ARNm et selon la méthode proposée par **Shi et al. en 2012 (voir fig. 4)**. Tout d'abord, un traitement DNase a été réalisé sur chaque extrait avec le kit Turbo DNA-free (Ambion) afin d'éliminer les traces d'ADN et ne conserver que l'ARN. Une queue poly-A a été ajoutée aux ARN totaux coté 5' à l'aide du Poly(A) Tailing Kit (Applied Biosystems). La synthèse des ADNc a été effectuée grâce au kit Reverse-Transcriptase SuperScript III (Invitrogen) selon les informations du fournisseur grâce à une amorce universelle Poly(T). La détection des miARNs d'intérêts au sein des ADNc est réalisée par PCR en point final avec les amorces forward spécifiques des miARNs et l'amorce reverse de l'adaptateur poly(T). Les quantités d'ADNc synthétisées dans les différents échantillons ont été évaluées au Nanodrop™

(Thermo Scientific) grâce au spectre d'absorbance caractéristique de l'ADN entre 200 et 300 nm. Leurs concentrations ont été normalisées à 30 ng.µL⁻¹, puis elles ont été diluées à 3 ng.µL⁻¹ (concentration 1X) et stockées à -20°C.

2) Ajustement des paramètres et analyse des résultats

La qPCR a été effectuée sur une machine LigthCycler 480 (Roche). L'analyse repose sur l'amplification de l'ADNc en présence d'un agent intercalent fluorescent (SYBR-Green) contenu dans le Kit PowerUp™ SYBR™ Green Master Mix (Thermo Fisher Scientific). A chaque cycle, la fluorescence spécifique du SYBR-Green mesurée renseigne sur la quantité d'amplicons présente dans les puits, à l'exception des cycles initiaux de bruit de fond lorsqu'il n'y a que très peu d'amplicons. Si l'amplification est efficace, une augmentation sigmoïde de la fluorescence a lieu entre chaque cycle jusqu'à un plateau de fluorescence dès lors que toutes les molécules de SYBR Green sont mobilisées.

Le cycle à partir duquel la fluorescence est 10 fois plus importante que le bruit de fond caractérise la quantité d'ADNc contenue initialement dans le puits et est appelé Ct (Cycle Threshold). L'établissement des paramètres précis de la manipulation fait partie intégrante du travail réalisé et est donc présenté dans la partie résultats.

En réalisant 2 gammes de dilution de solution d'ADNc de concentration connue, il est possible de déterminer les efficacités d'amplifications moyennes propres à chaque couple d'amorces. L'efficacité est calculée à partir de la valeur de la pente de la droite de régression linéaire des Ct en fonction du log des concentrations d'ADNc ($E = 10^{(-1/\text{pente})}$). La solution d'ADNc utilisée pour les gammes a été réalisée à partir d'un mélange équimolaire de l'ensemble des ADNc des échantillons. Les rapports d'expressions relatives de miARN dans les échantillons suivis ont été calculés selon la méthode de Pfaffl (Fold Change = $\frac{E_{\text{miARN}}^{\Delta Ct(\text{Ct contrôle} - \text{Ct stress})}}{E_{\text{gène de ménage}}^{\Delta Ct(\text{Ct contrôle} - \text{Ct stress})}}$) (Pfaffl, 2001). Celle-ci permet d'ajuster entre les échantillons les efficacités d'amplifications (propres à chaque couple d'amorces) aux valeurs de Ct obtenues, alors que la méthode $2^{-\Delta\Delta Ct}$ ne le permet pas et requière une forte homogénéité des efficacités.

II) Validation fonctionnelle des miARNs *Spartina* par approche mutants T-DNA chez *Arabidopsis*

Des gènes de spartines codant des miARNs (gènes *MIR*) ont été préalablement déterminés comme potentiellement impliqués dans la tolérance au PHE par des analyses de séquençage. Les miARNs sélectionnés pour cette étape de validation en système hétérologue

Tableau I : Lignées mutantes de gènes *MIR* dont les graines ont été commandées.

miARNs de spartines	pri-MIR d' <i>A. thaliana</i>	Chromosomes	Lignées T-DNA	Site d'insertion
Spar- miR156j / miR156e	-	Chr2	FLAG_173C12	-
			SALKseq_071642.1	-
			SAIL_37_D11	-
Spar- miR156e / miR156j	ath-MIR156e	Chr5	FLAG_090F02	Exon
			FLAG_104E09	Exon
			SAIL_276_F02	-
Spar- miR156e / miR156c / miR156j	ath-MIR157a	Chr1	FLAG_375C03	300-UTR3
			GABI_102D08	1000-Promotor
			GABI_025E11	1000-Promotor
Spar-miR156c	ath-MIR157b	Chr1	FLAG_448G01	300-UTR3
			FLAG_461D10	300-UTR5
	ath-MIR157c	Chr3	SALKseq_068725.0	1000-Promotor
			GABI_369D05	Exon
Spar-miR159d	ath-MIR159b	Chr1	SALKseq_064252.2	300-UTR3
			GABI_761H01	300-UTR3
			SAIL_770_G05	Exon
Spar- miR167_1b / miR167_1g	ath-MIR167b	Chr3	SALKseq_030399.2	Exon
			SALKseq_058222.1	300-UTR3
			FLAG_555C05	Exon
Spar-miR167_1b	ath-MIR167c	Chr3	FLAG_435G11	300-UTR5
			GABI_345B04	300-UTR3
			FLAG_121D02	Exon
Spar - miR169_2b / miR169_2c	ath-MIR169d	Chr1	SAIL_284_G11	300-UTR3
			SAILseq_284_G11.0	300-UTR3
			SALK_015272.42.40.x	Exon
Spar-miR395d	ath-MIR395d	Chr1	GABIseq_278B04.1	Exon
			SALK_030237.17.90.x	Exon
	ath-MIR395f	Chr1	GABI_493H06	Exon
			SALKseq_122681.1	300-UTR5
Spar-miR397b	ath-MIR397b	Chr4	SALK_130387.48.00.x	300-UTR5
			SALK_022530.15.95.x	Exon
			SALK_144745.52.25.x	300-UTR3
Spar- miR408b / 408c	ath-MIR408	Chr2	SALKseq_030899.1	300-UTR3
			SALK_072720.19.20.x	Exon
			SALKseq_134959.1	300-UTR5
			SALKseq_053944.2	300-UTR3
			SALK_023586.22.40.x	Exon
			GABIseq_497G12.1	Exon
			SALKseq_081087.0	300-UTR5

Légende : En rouge les graines qui n'ont pas été reçues

Tableau II : Lignées mutantes de gènes cibles des miARNs dont les graines ont été commandées.

Gène cible	Description du gène	Lignée T-DNA	Site d'insertion
AT1G05030.1	Major facilitator superfamily protein	GABI_144A09	Exon
AT1G13080.1	cytochrome P450, family 71, subfamily B, polypeptide 2	GABI_378E04	Exon
AT1G15520.1	pleiotropic drug resistance 12	SAIL_383_G05	Exon
AT1G16220.1	Protein phosphatase 2C family protein	GABI_057A01	Exon
AT1G26665.1	Mediator complex, subunit Med10	GABI_436B01	Exon
AT1G65380.1	Leucine-rich repeat (LRR) family protein	GABI_686A09	Exon
AT1G76690.1	12-oxophytodienoate reductase 2	SALK_116381.45.60.x	Exon
AT3G27540.1	beta-1,4-N-acetylglucosaminyltransferase family protein	GABI_616G02	Exon
AT4G02080.1	secretion-associated RAS super family 2	SAIL_1221_F10	Exon
AT4G02570.4	cullin 1	SAIL_170_C05	Exon
AT4G09570.1	calcium-dependent protein kinase 4	SAIL_283_E11	Exon
AT4G22200.1	potassium transport 2/3	GABI_152C05	Exon
AT4G26910.1	Dihydroipoamide succinyltransferase	SALK_005851.53.50.x	Intron
AT5G44800.1	chromatin remodeling 4	SAIL_39_D06	Exon
AT5G47720.4	Thiolase family protein	SAIL_448_H10	Exon
AT5G53190.1	Nodulin MtN3 family protein	GABI_699D08	Exon
ATCG00790.1	ribosomal protein L16	GABI_221E02	Exon

Légende : En rouge les graines qui n'ont pas été reçues

étaient soit sous-exprimés chez l'espèce tolérante *S. anglica* en condition de stress et ciblaient des gènes du xénome, ou des transcrits dégradés détectés dans les données de séquençage (**Cavé-Radet et al.**, soumis pour publication). Des homologues de ces gènes *MIR* candidats annotés chez *Spartina* ont été identifiés chez *A. thaliana*, et des mutants T-DNA (« knock-out » ou « knock-down ») de ces loci ont été sélectionnés sur la base de données SIGnAL (<http://signal.salk.edu/cgi-bin/tdnaexpress> ; **Alonso et al., 2003** ; **Yamada et al., 2003**). Les lignées mutantes et leurs miARNs correspondants chez *Arabidopsis* et *Spartina* sont présentés dans le **Tableau I**.

L'étude de certains des gènes cibles dont l'expression est potentiellement régulée par les miARNs différentiellement exprimés chez *Spartina* en réponse au PHE a également été réalisée en système hétérologue chez *A. thaliana*. Les mutants correspondants ont été sélectionnés comme indiqué précédemment et sont présentés dans le **Tableau II**.

Les graines des lignées de mutants insertionnels T-DNA d'*Arabidopsis* GABI, SALK et SAIL ont été commandées au NASC (Nottingham Arabidopsis Stock Center, Royaume-Uni), les lignées GABI-Kat au CeBiTec (Center for Biotechnology) de l'Université de Bielefeld (Allemagne) et celles des lignées FLAG au Genomic Resource Center de l'INRA de Versailles (France).

1) Stérilisation des graines

Dans des tubes stériles et sous hôte à flux laminaire, un prélavage rapide des graines a été effectué à l'éthanol 70%, suivi d'une stérilisation pendant 3 mn sous agitation réalisée avec une solution d'éthanol 50% contenant 1,5% de chlore actif, suivi de trois rinçages successifs similaires au prélavage. Les tubes ont ensuite été séchés sous hôte quelques heures avant que les graines ne soient semées. Différents ajustements du protocole ont été testés suite au développement récurrent de champignons au niveau des graines en germination, le temps de stérilisation a finalement été étendu à 4 mn.

2) Criblage phénotypique primaire

Une fois stérilisées, les graines des différentes lignées ont été déposées uniformément par 20 en deux rangés de 10 graines dans des boîtes de Pétri carrées sur milieu de Murashige et Skoog avec vitamines de Gamborg (Sigma-Aldrich) dilué au demi avec de l'eau Millipore (milieu MS/2, soit 2.2 g.L⁻¹ ; 1% de sucrose; 0,8% agar ; pH= 5,6). A partir d'une solution stock de PHE à 100 mM ajoutée dans le milieu liquéfié, la concentration en PHE est ajustée à 25 µM dans chaque boîte pour permettre de discriminer les lignées sur la base de leur phénotype en

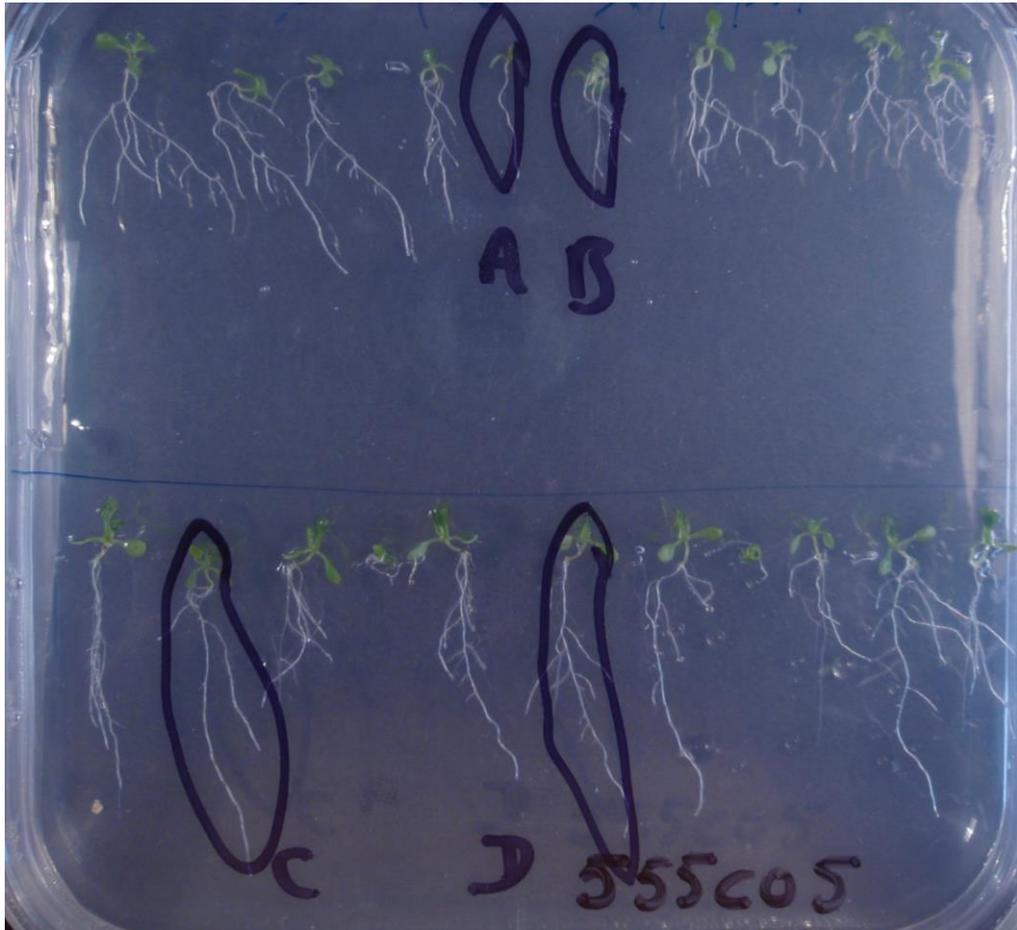


Figure 5 : Exemple de sélection de 4 plantules A, B, C et D issues des générations T2 d'individu hétérozygote sur un milieu MS/2 (+ 1% saccharose et 0,8% d'agar) à 25 μ M de phénanthrène.

Les phénotypes des plantules issues des graines du mutant de génération T2 FLAG 555C05 sont hétérogènes, A et B présentent une racine primaire moins développée que les mutants C et D, ces quatre individus ont donc été repiqués en pot et génotypés.

condition de stress. Afin d'inhiber la dormance des graines, les boîtes ont été stockées à l'obscurité et à -4°C pendant 48 heures avant d'être transférées en armoire phytotronique pendant 14 jours avec un cycle jour:nuit 16:8h, à 8500 Lux, 22:20°C et 60% d'humidité relative.

La taille de la racine primaire a été mesurée pour chacune des plantules à l'aide d'ImageJ (version 1.51) et les mesures ont été comparées sous R (version R 3.3.2 ; **R Core Team 2018**) avec RStudio (version 1.0.136). Le test de comparaison de moyenne multiple non-paramétrique de Kruskal-Wallis a permis de calculer la significativité des différences d'élongation entre les différentes lignées et conditions. Le package ggplot2 (version 2.2.1) a servi à la création des graphiques et Inkscape (version 0.92.2) aux annotations des p-values sur les graphiques. Seules les lignées dont l'élongation de la racine primaire différait significativement (avec une p-value < 0,05%) de celle des boîtes contrôle de leur fonds génétique ont été retenues, respectivement l'accession Col-0 pour les lignées GABI, SAIL et SALK provenant du NASC et Ws pour les lignées FLAG provenant du Versailles Arabidopsis Stock Center.

3) Production de graines homozygotes

a) Culture des plantes

Si un phénotype significativement différent du fonds génétique sauvage (Col-0 ou Ws) était observé chez les mutants, des individus ont été choisis aléatoirement pour être repiqués dans des pots de terreau, à raison de 2 ou 4 individus au sein des lignées certifiées homozygotes et de 8 ou 16 au sein des lignées hétérozygotes (voir **fig. 5**). Ces pots ont été disposés sur des plateaux pour permettre l'arrosage, couverts d'une feuille plastifiée durant la première semaine de culture pour favoriser la conservation de l'humidité et placés dans des armoires phytotroniques avec un cycle jour:nuit 16h:8h, à 8500 Lux, 20°C et à une humidité relative de 90 %.

Après deux semaines, les plants ont été tuteurés et isolés les uns des autres à l'aide de films micro-perforés ; et des feuilles ont été prélevées pour l'extraction d'ADN et le génotypage par PCR (voir partie suivante). A partir de 20 jours, le cycle est passé en jour:nuit 18h:6h, à 8500 Lux, 22°C et à une humidité relative de 60% pour favoriser la montée en graine. Après 2 mois de culture, les autofécondations des plants homozygotes des loci choisis ont produit des graines elles aussi homozygotes à ce locus, graines récoltées à l'aide d'un tamis et stockées en vue des analyses suivantes dans des tubes stériles conservés à l'obscurité.

b) Echantillonnage et extraction d'ADN

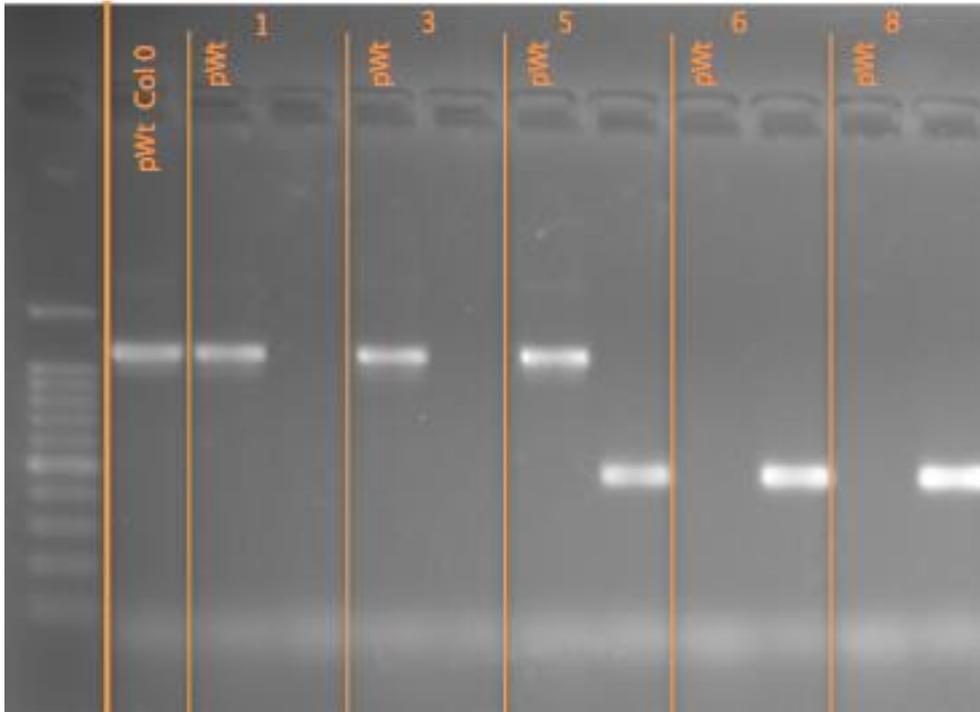


Figure 6 : Profils génotypiques retrouvés en électrophorèse.

A l'extrémité gauche : migration du Ladder 100 bp permettant l'approximation de la taille des fragments amplifiés. Les bandes blanches représentent les produits d'amplification PCR avec les amorces spécifiques révélés par la fluorescence du BET et séparés en fonction de leur taille par la migration en électrophorèse.

pWt Col-0 : Vérification de la présence et de l'amplification de la séquence du gène non muté (sauvage) chez l'écotype sauvage Col-0 avec le couple d'amorces spécifiques RP-LP.

- Dans chaque colonne :
- **Côté gauche (pwt)** : Vérification de la présence de la séquence du gène sauvage chez les individus issus de la génération T2 avec le couple d'amorces spécifiques RP-LP.
 - **Côté droit** : Vérification de la présence de la séquence flanquante du fragment T-DNA chez l'individu correspondant avec le couple d'amorces spécifiques RP-LB.

(Individus 1 et 3 homozygotes sauvage, individu 5 hétérozygote, individus 6 et 8 homozygotes mutant)

Le génotypage des plantules par PCR a été nécessaire pour sélectionner les mutants homozygotes. Deux semaines après le repiquage des plants, 3 à 5 mg de feuilles vertes de la rosette ont été prélevés sur chacune des plantes et placés dans des microtubes de 1,5 mL à -80°C. Selon une méthode d'extraction d'ADN en une seule étape proposée par **Kasajima et al. (1991)**, une solution d'Edward composée de 200 mM de Tris-HCl, 250 mM de NaCl, 25 mM d'EDTA et de 0,5% de SDS a été diluée au 1:10 avec un tampon d'extraction composé de 10 mM de Tris-HCl et de 1 mM d'EDTA. Dans chacun des tubes, 200 µL de cette solution ont été ajoutés avec une bille métallique de 3 mm de diamètre avant de les passer au broyeur à bille (Rescht MM400) pendant 1 mn à une fréquence de 30 coups/s. Les tubes sont ensuite centrifugés à 14 000 rpm pendant 5 mn pour culoter les débris cellulaire et 100 µL du lysat clair sont prélevés et conservés à -20°C.

Lorsque l'amplification des fragments ADN en PCR n'a pas fonctionné, une purification par précipitation de l'ADN a été réalisée par ajout de 100 µL d'isopropanol, vortexage 1 mn, attente de 20 mn à température ambiante suivi d'une centrifugation (15 mn, 14 000 rpm, 4°C). Le surnageant a été éliminé, le culot rincé à l'éthanol 70%, suivi d'une nouvelle centrifugation (15 mn, 14 000 rpm, 4°C), élimination du surnageant et séchage du culot. L'ADN ainsi obtenu a été suspendu dans 50 µL d'eau ultra-pure stérile et conservé à -20°C.

c) Génotypage des individus en culture

Le génotype des différents individus des lignées mutantes a été déterminé par les profils électrophorétiques des produits des Réactions de Polymérisation en Chaîne (PCR) selon les amorces spécifiques utilisées pour cibler les loci sauvages et mutants concernés (**fig. 6**). Pour chacune des lignées, la présence de l'allèle sauvage a été vérifiée sur l'ADN extrait de l'individu correspondant au fond génétique (Col-0 ou Ws) en amplifiant le fragment concerné à l'aide des amorces spécifiques LP et RP des séquences flanquantes (pWT). Pour chacun des individus mutants, 2 puits ont été réalisés, l'un contenant les amorces LP et RP pour évaluer la présence de l'allèle sauvage et l'autre contenant l'amorce RP et l'amorce LB spécifique de la séquence flanquante du T-DNA sur le brin opposé (pT-DNA).

Le volume réactionnel des PCR a été établi à 15 µL (1X Green GoTaq Buffer, 1,5 mM MgCl₂, 200 µM dNTP, 0,02 U GoTaq Flexi, 0,4 mM de chaque amorce). Le thermocycleur (MasterCycler, Eppendorf) a suivi le programme suivant : 1 mn à 85°C suivi de 2 mn à 94°C puis 35 cycles (30 s 94°C ; 30 s 48°C ; 1 mn 72°C), suivi d'une élongation finale de 7 mn à 72°C. Des volumes de 10 µL des produits de réaction ont été déposés sur un gel d'agarose à 2% en TAE 1X (Tris, acide acétique, EDTA) pour migrer environ 1h20 à 80V ; un marqueur de poids moléculaire est également déposé (100pb Ladder, Promega). Les bandes d'ADN ont

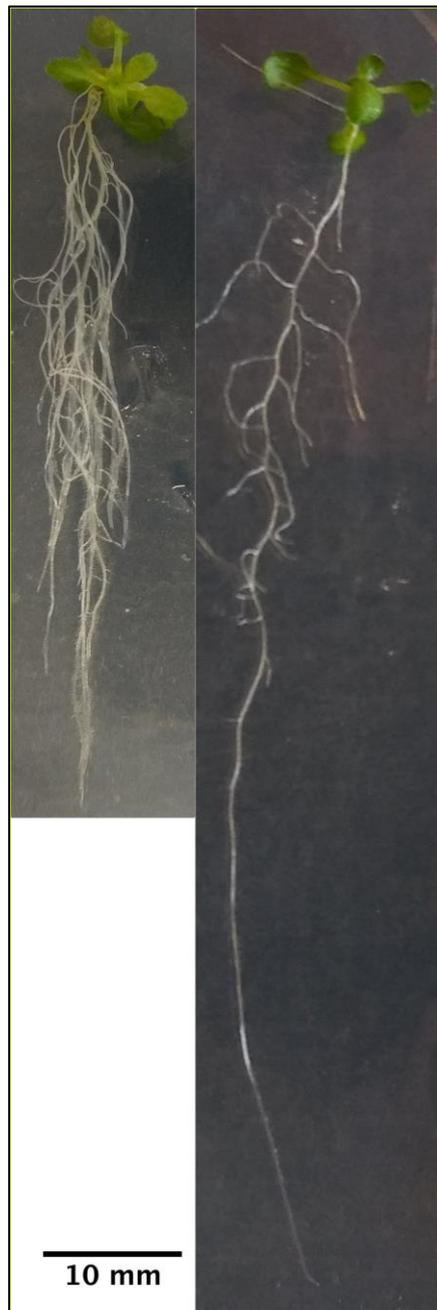


Figure 7 : Phénotypes de Col-0 après 1 semaine de germination sur 2 milieux de culture différents.

A gauche : milieu MS/2 + 1 % saccharose et 0.8% d'agar

A droite : milieu de Hoagland + 1% de saccharose et 0.8% d'agar

ensuite été révélées sous UVs après un bain de 10 mn sous agitation dans une solution de BET à $0,5 \mu\text{g.mL}^{-1}$ suivi d'un rinçage de 10 mn dans un bain d'eau.

4) Phénotypage des lignées mutantes homozygotes

Les graines des différentes lignées homozygotes ont été semées sur milieux sans (contrôle) et avec PHE (traité), et comparées dans les mêmes conditions au fonds génétique correspondant. Pour chacune des lignées mutantes, les comparaisons s'effectuent deux à deux entre mutants T-DNA, écotypes sauvages, et traitements. En utilisant le milieu MS/2 comme lors du criblage primaire, les plantules présentaient un fort développement des racines latérales, c'est pourquoi le milieu d'Hoagland (Caisson labs) qui n'entraînait pas ce phénotype a remplacé le milieu MS/2 dans les composants du milieu gélosé (voir **fig. 7**).

Il a également été constaté que le PHE avait un impact sur la germination des graines, après une stratification de 48h et le transfert en armoire phytotronique, les graines germent plus tardivement sur milieu contenant du PHE par rapport à celles germant sur un milieu contrôle. Dans cette partie de l'expérimentation, les graines ont donc systématiquement été semées sur milieu de Hoagland sans PHE, puis, après 48h de stratification et 3 jours de croissance, les graines en germination ont été transférées dans de nouvelles boîtes contenant du milieu avec les caractéristiques souhaitées.

Les résultats phénotypiques s'avérant peu significatif à $25 \mu\text{M}$ de PHE, la concentration a d'abord été augmentée à $50 \mu\text{M}$, puis par pallier jusqu'à $200 \mu\text{M}$, cette concentration apparaissant alors comme étant la plus appropriée. Ainsi, la taille de la racine primaire des individus homozygotes aux loci souhaités a été mesurée de la même manière que lors du criblage phénotypique primaire.

III) Validation fonctionnelle des miARNs *Spartina* par approche miPEP

Pour obtenir un effet visible du traitement, il est nécessaire d'appliquer régulièrement le miPEP à une concentration de $100 \mu\text{M}$ par dépôt sur les racines en développement en restant dans des conditions stériles (J-P Combiér, UMR CNRS 5546 LRSV Université de Toulouse/microPEP technologies, communication personnelle). Les miPEPs utilisés ont été sélectionnés selon l'impact observé de la mutation du gène *MIR* qui leur correspondait lors du criblage préliminaire des mutants. Les séquences ont été déduites des séquences des pri-miARNs par le Laboratoire de Recherche en Sciences Végétales de Castanet-Tolosan à l'origine de leur découverte. Le laboratoire a synthétisé les miPEPs qui ont été réceptionnés et stockés à -3°C avant d'être solubilisés à 10 mM et dilués afin d'obtenir des solutions à 1 mM ,

stockées à -80°C. Les solutions ne pouvant pas être recongelées, elles ont été aliquotées en 20µL à 100 µM. Les graines d'*Arabidopsis* ont été stérilisées et semées sur un milieu de culture de la même manière que pour le phénotypage (partie II-b). Après 48h de stratification et 6 jours de germination dans les conditions standard, elles ont été transférées dans des boîtes sans PHE et séparées afin d'être traitées avec les différents miPEPs ou servir de contrôles. Sous hôte à flux laminaire, les aliquots sont appliqués à l'aide d'une pipette sur toute la longueur des racines des plantes traitées.

Après un premier traitement sur un milieu sans PHE et 24h de délai, les plantules ont été transférées sur un milieu de Hoagland + saccharose à 200 µM PHE. Afin d'éviter l'effet de position dans l'armoire phytotronique, la comparaison a été réalisée dans la même boîte, ainsi une bande d'environ 1 cm de largeur du milieu gélosé est retirée entre les plantules témoins et traitées afin que les miPEPs ne diffusent pas dans le milieu des témoins. Un traitement miPEP est immédiatement réalisé après le transfert, puis les boîtes sont scellées, photographiées et placées dans l'armoire pour poursuivre l'expérience une semaine durant à raison de 3 traitements par semaine et 4 réplicats biologiques.

Résultats

I) Confirmation des profils d'expressions des miARNs obtenus par small-RNAseq

Afin de déterminer les changements d'expressions des miARNs sous l'effet de l'hybridation et la duplication génomique en réponse au PHE, le séquençage des petits ARNs a été réalisé à partir d'extraits d'ARN des feuilles des 4 espèces de spartines, ces derniers au cœur de cette étude ont été obtenus par RNAseq grâce à un séquenceur short-read NextSeq500 (Illumina), à la fois en conditions contrôle et de stress pour deux réplicats biologiques par espèce et traitement. Les analyses intra-espèce ont révélé que 103 gènes *MIR* au total sont différenciellement exprimés entre conditions contrôle et PHE.

Cela étant, il est nécessaire de valider les niveaux d'expressions des gènes *MIR* par RT-PCR quantitative. Ici, l'expression relative des miARNs est normalisée par rapport à un gène de ménage, considéré comme un gène dont l'expression est constitutive et avec un niveau d'expression stable. La transcription inverse des ARN totaux en ADNc a été réalisée selon la méthode décrite par **Shi et al.** en 2012 (voir **Matériel et Méthode**). Ces derniers sont utilisés comme matrices pour l'amplification des miARNs grâce à des amorces spécifiques complémentaires (voir **Tableau III**).

Tableau III : Séquences des amorces utilisées pour la synthèse des ADNc et leur amplification en qPCR.

Amorce	Séquence
poly(T)_adaptor	GCGAGCACAGAATTAATACGACTCACTATAGGTTTTTTTTTTTTVN
poly(T)_adaptor_RP	GCGAGCACAGAATTAATACGAC
Spar-new_miR_25 (ARNr 5S)	AAGTCCTCGTGTTGCATCCCT
miR156c	TTGACAGAAGATAGAGAGCAC
miR156e	TGACAGAAGAGAGTGAGCACA
miR397b	TTGAGTGCAGCGTTGATGAAA
miR408b	CTGCACTGCCTCTCCCT
miR169_2b	ATCGGCAAGTTGTCCTTG
miR169_2c	TGCAGCCAAGGATGACTTGCC
miR167_1b	TGAAGCTGCCAGCATGATCTA
miR160	GTGCAAGGGGCCAAGCAT
conserved_miR_4	AAACCTGGCTCTGATACCA
new_miR_236	ACTCCCTCCGTTCTTTTTTAC
new_miR_56	GCTCTGAAATTGTTGTCATTAGG
new_miR_107	ATTGGTATCGGCTGATGTAAG

Légende : En vert l'amorce RP de l'adaptateur Poly(T) utilisée dans toute les réactions, en bleu l'amorce spécifique du gène de ménage

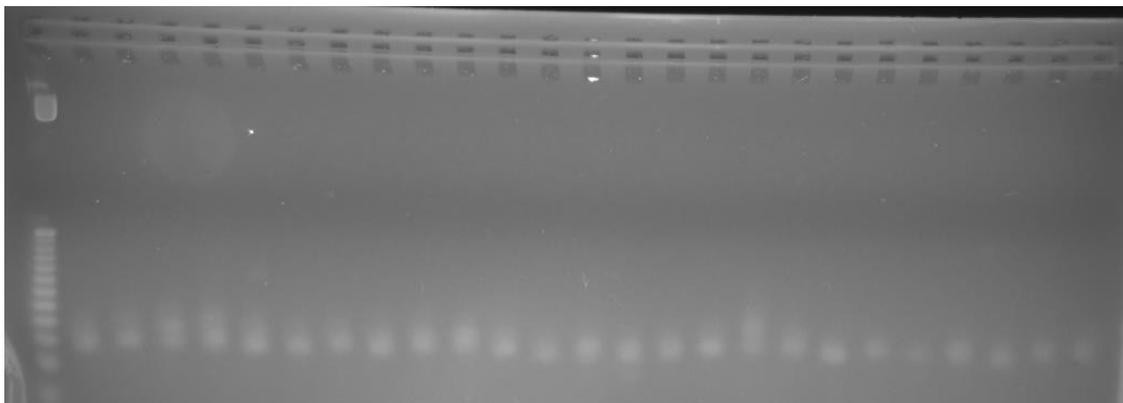


Figure 8 : Résultat d'électrophorèse de la PCR testant les couples d'amorces amplifiant chacun spécifiquement un ADNc d'un gène *MIR* en vue de la qPCR.

A l'extrémité gauche : migration du Ladder 25 bp permettant l'approximation de la taille des fragments amplifiés. Les bandes blanches représentent les produits d'amplification PCR avec les amorces spécifiques révélés par la fluorescence du BET et séparés en fonction de leur taille par la migration en électrophorèse.

1) Validation des amorces des miARNs par PCR en point final

Les couples d'amorces ont été testés en PCR simple pour vérifier que les amorces produisaient des amplicons spécifiques (**fig. 8**), ceux qui ne permettaient pas d'amplification n'ont pas été utilisés pour la RT-qPCR et les profils d'expression gènes *MIR* correspondant n'ont donc pas été vérifiés.

2) Ajustement des paramètres de RT-qPCR

L'analyse d'expression de miARNs par qPCR représente un challenge qui a été réalisé pour la première fois au cours de cette expérimentation au sein du laboratoire d'accueil. Obtenir des valeurs Ct supérieures à 35 cycles équivaut en théorie à ce qu'il y ait moins d'une copie de la séquence d'ADNc dans l'échantillon, il est donc primordial de parvenir à établir un protocole permettant une amplification suffisante à chaque cycle pour évaluer correctement le niveau d'expression du gène.

Dans cette étude, des tests préliminaires ont été réalisés en utilisant un mélange équimolaire des solutions d'ADNc pour ajuster les différents paramètres de RT-qPCR. Premièrement, différents volumes réactionnels ont été testés (10, 15 et 20 μ L finaux), en volume final de 20 μ L par point PCR, permettant d'obtenir un signal de fluorescence suffisamment précoce pour étudier la plupart des gènes retenus. Une augmentation de la quantité de Taq polymérase dans les puits a été testée par rapport à la concentration d'origine du mix SYBR-Green commercialisé, mais sans améliorer les résultats. Des concentrations croissantes d'amorces allant de 0,2 à 0,8 μ M ont également été testées en PCR classique (par paliers de 0,2 μ M). La concentration finale de 0,8 μ M a été retenue de façon à travailler avec une quantité qui apparaît non limitante pour les réactions d'amplification, et favorisant également l'augmentation rapide de la fluorescence.

Le programme du LightCycler initialement proposé était le suivant : 10 mn de dénaturation à 95°C ; suivi de 45 cycles : 15 s 95°C, 15 s 60°C, 20 s 72°C ; et une étape d'élongation finale de 7 mn 72°C. Finalement, le cumul des hautes températures au fur et à mesure des cycles étant soupçonné d'inhiber l'activité de la Taq polymérase, les étapes d'appariement des amorces et d'amplification ont été fusionnées. Le cycle finalement utilisé a donc été : 3 mn de dénaturation à 95°C ; suivi de 45 cycles : 15 s 95°C, 20 s 60°C ; et une élongation finale de 7 mn 72°C.

3) Analyse des niveaux d'expression des miARNs

Tableau IV : Efficacités moyennes d'amplification des différents miARNs suivis.

miARN	Efficacité moyenne
Spar-miR156c	2,089
Spar-miR156e	1,68
Spar-miR397b	1,673
Spar-miR408b	2,099
Spar-miR169_2b	2,154
Spar-miR169_2c	2,036
Spar-miR167_1b	2,2
Spar-miR160	2,002
Spar-conserved_miR_4	2,036
Spar-new_miR_236	1,508
Spar-new_miR_56	2,248
Spar-new_miR_107	1,973
Spar-new_miR_25 (ARNr 5S)	2,07

Légende : Les efficacités moyennes sont propres à chaque couple d'amorces utilisé et dépendent des paramètres de qPCR établis précisément (voir **Résultats**). En bleu : gène de ménage servant à la normalisation des résultats.

Une gamme de dilution au quart en 5 points à partir d'une solution d'ADNc à 3ng/μL et 5ng d'ADNc dans les puits contenant les plus grandes concentrations a été réalisée en 2 réplicats techniques afin de déterminer les efficacités d'amplifications moyennes propres à chaque couple d'amorces. Les moyennes d'efficacité des couples d'amorces des deux gammes servent de valeurs de références pour le calcul de quantité relative d'ADNc des 4 espèces de spartines dans les 2 conditions et sont présentées dans le **Tableau IV**.

Au total, 24 échantillons d'ADNc ont été générés pour valider les profils d'expression identifiés chez *Spartina* (3 réplicats biologiques, 4 espèces, conditions contrôle et traitement au PHE). L'expression différentielle de 12 miARNs d'intérêts a ainsi put être quantifiée en normalisant les niveaux d'expressions des différents gènes avec celui d'un gène de ménage choisi (ARNr 5S). Les différences d'expressions (Fold Change) exprimées en log₂ sont présentées **Figure 9** en comparaison aux changements d'expression précédemment calculés avec les données RNAseq.

Certains changements d'expression sont significatifs selon une méthode d'analyse et sont corroborés par l'autre. C'est le cas des profils des gènes Spar-miR156e et Spar-miR397 dont l'expression augmente chez *S. alterniflora* en cas d'exposition au PHE (**fig. 9 C, H**). De la même manière, les gènes dont l'expression est significativement réduite selon les deux méthodes avec l'exposition au PHE sont les gènes Spar-miR167_1b chez *S. x townsendii* (**fig. 9 E**) et le gène Spar-miR160 (**fig. 9 D**) chez *S. anglica*. Le gène Spar-miR160, et le nouveau gène *MIR* annoté Spar-new_miR_56 sont également sous régulés en condition de stress chez *S. anglica* (**fig. 9 J, K**).

En revanche, le nouveau gène annoté Spar-new_miR_236 a deux profils de changement d'expression inverse l'un par rapport à l'autre selon les méthodes (**fig. 9 L**), avec une surexpression significative en condition de stress selon la méthode EDA-DESeq2 et une sous régulation selon la RT-qPCR.

Certains miARNs n'ont pas été détectés par les deux méthodes chez certains individus quelles que soient les conditions, comme ceux correspondants aux gènes Spar-miR169_2b, Spar-miR169_2c et Spar-new_miR_236 chez *S. alterniflora* (**fig. 9 F, G, L**) et celui du gène Spar-new_miR_107 chez *S. maritima* (**fig. 9 K**).

Concernant les changements d'expression qui n'ont pas été décrit précédemment, au moins l'une des deux méthodes n'a pas permit d'attribuer une significativité suffisante aux résultats. Certains profils ne sont pas significatifs avec la méthode EDA-DESeq2 mais le sont avec la méthode RT-qPCR, et inversement, par exemple les 4 profils d'expressions du gène Spar-miR408b chez les 4 espèces de spartines étudiées. Au total, 6 profils de miARNs

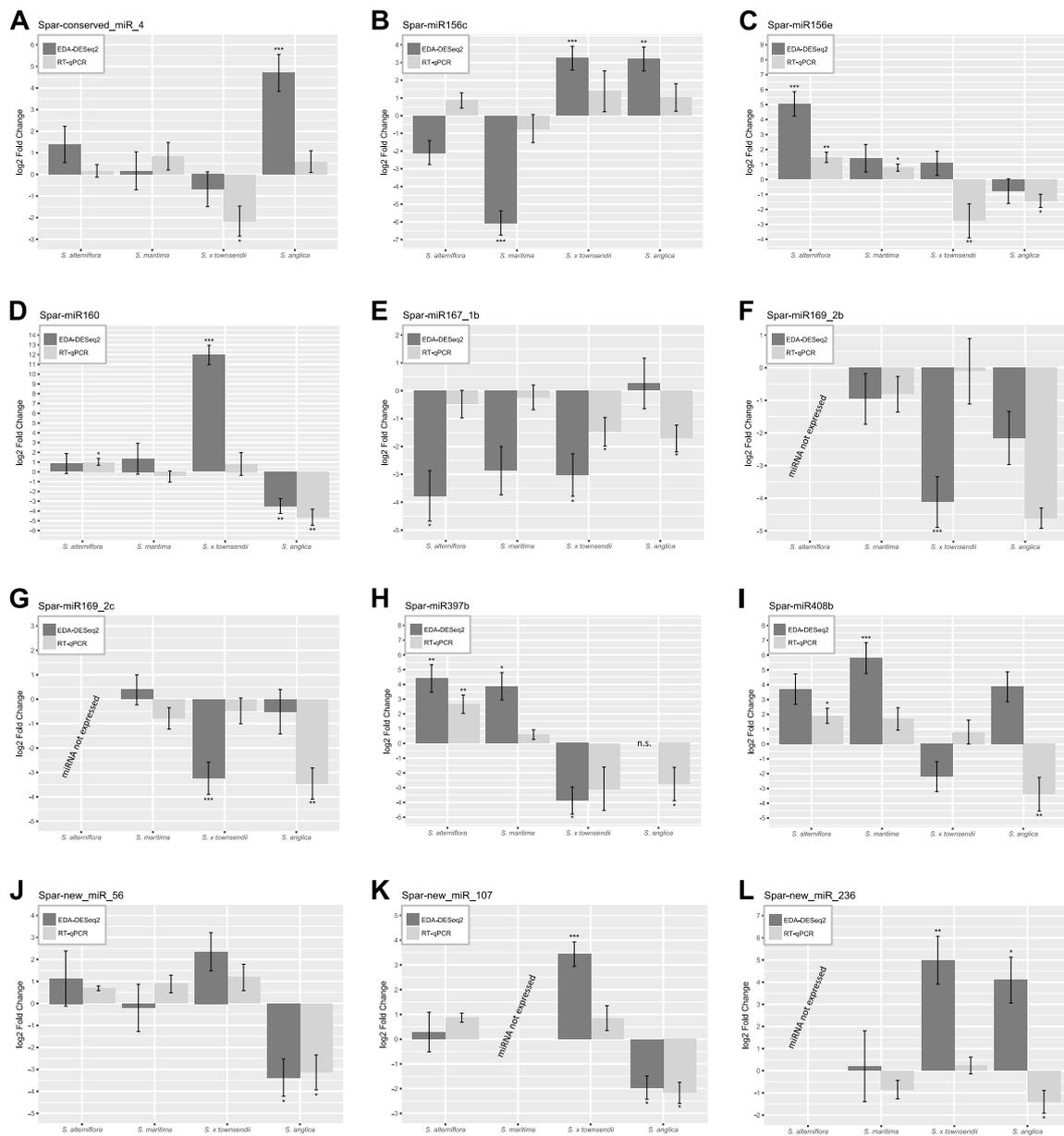


Figure 9 : Comparaison des résultats obtenus par EDA-DESeq2 et RT-qPCR des changements d'expression des gènes *MIR* de spartines en comparaison intra-spécifique entre conditions contrôle et stress par le phénanthrène.

Les barres d'erreurs représentent pour chaque test la valeur de l'erreur standard et les annotations la p-valeur associée (* : $p\text{-val} \leq 0,05$; ** : $p\text{-val} \leq 0,01$; *** : $p\text{-val} \leq 0,001$).

significativement différentiellement exprimés selon la méthode EDA-DESeq2 ont été validés par qPCR, 13 autres présentent des profils cohérents (mais non significatifs). En revanche, un seul (Spar-new_miR_236) est caractérisé par des changements d'expression significatifs mais opposés.

II) Etude de l'impact des mutations des miARNs d'intérêts sur la tolérance d'Arabidopsis au phénanthrène

Afin de déterminer l'impact de ces miARNs dans la réponse au PHE, l'analyse par validation fonctionnelle en système hétérologue chez *Arabidopsis* a été réalisée dans le cadre du travail de stage. Pour cela, les miARNs homologues aux miARNs candidats chez *Spartina* ont été identifiés par homologie de séquence (séquences 100% identiques) et prédiction *de novo* sur le génome d'*Arabidopsis* (2 mésappariements tolérés ; miR-PREFeR, **Lei & Sun, 2014** ; **Cavé-Radet et al.**, soumis pour publication).

1) Optimisation des conditions de phénotypage

Dans ce travail, il a été décidé d'utiliser la longueur de la racine primaire comme indicateur du stress, initialement sur un milieu MS/2 contenant 1% de saccharose. Les essais préliminaires ont mis évidence l'effet du milieu de culture sur le développement d'*Arabidopsis*. Le premier milieu testé, MS/2 + 1% saccharose et 0,8% d'agar, entraîne la formation de nombreuses racines latérales, que ce soit en condition contrôle ou de traitement au PHE. Ce phénotype récurrent entre les différents mutants testés n'est pas approprié au phénotypage de l'élongation de la racine primaire, d'une part parce que la racine principale est difficilement observable parmi les racines secondaires très développées et, d'autre part, parce que le développement de la racine principale pourrait être impacté négativement par le développement concurrentiel des racines secondaires. Il a donc été nécessaire de mettre en place des conditions qui favorisent le développement de la racine principale uniquement pour ne pas masquer l'effet que peut avoir le PHE. Après plusieurs tentatives, il a été constaté que le milieu Hoagland favorise davantage le développement de la racine principale (voir **Matériel et Méthodes**). Ces conditions de cultures ont donc été retenues pour réaliser la suite du phénotypage. Dans un premier temps, il a été nécessaire d'étudier l'effet dose-réponse du PHE sur le phénotype (développement de la racine primaire). Sur le milieu de Hoagland, l'effet du PHE sur le développement est une réduction de la croissance des racines primaires des écotypes Col-0 et Ws, effet qui augmente avec la concentration en PHE du milieu entre 0 et 300 μ M (données non présentées). Dans un second temps, les phénotypes des mutants ont été comparés à ceux de

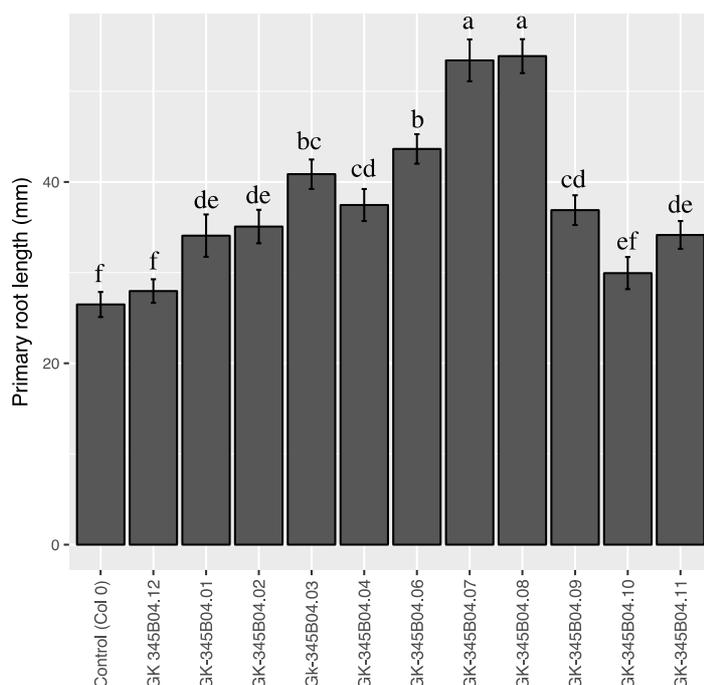


Figure 10 : Effet du phénoanthrène sur le développement des racines de plantules Col-0 et issues des graines de 12 mutants de la génération T2.

(les barres annotées de lettres différentes sont significativement différentes selon le test de Kruskal-Wallis)

Tableau V : Récapitulatif des données acquises sur le génotype des mutants en culture.

miARN de spartines différentiellement exprimé	pri-MIR d'A. thaliana homologue	Chromosome	Lignée T-DNA	Site d'insertion
Spar- miR156j / miR156e	-	Chr2	FLAG_173C12	-
			SALKseq_071642.1	-
Spar- miR156 / miR156j	ath-MIR156e	Chr5	FLAG_090F02	Exon
			SAIL_276_F02	-
Spar- miR156e / miR156c / miR156j	ath-MIR157a	Chr1	FLAG_375C03	300-UTR3
			GABI_102D08	1000-Promotor
			GABI_025E11	1000-Promotor
Spar-miR156c	ath-MIR157b	Chr1	FLAG_448G01	300-UTR3
			SALKseq_068725.0	1000-Promotor
	ath-MIR157c	Chr3	GABI_369D05	Exon
			SALKseq_064252.2	300-UTR3
Spar-miR159d	ath-MIR159b	Chr1	GABI_761H01	300-UTR3
			SAIL_770_G05	Exon
			SALKseq_030399.2	Exon
			SALKseq_058222.1	300-UTR3
Spar- miR167_1b / miR167_1g	ath-MIR167b	Chr3	FLAG_555C05	Exon
			FLAG_435G11	300-UTR5
			FLAG_121D02	Exon
Spar-miR167_1b	ath-MIR167c	Chr3	SAIL_284_G11	300-UTR3
			SAILseq_284_G11.0	300-UTR3
			SALK_015272.42.40.x	Exon
Spar - miR169_2b / miR169_2c	ath-MIR169d	Chr1	GABIseq_278B04.1	Exon
			SALK_030237.17.90.x	Exon
			GABI_493H06	Exon
Spar-miR395d	ath-MIR395d	Chr1	SALKseq_122681.1	300-UTR5
			SALK_130387.48.00.x	300-UTR5
	ath-MIR395f	Chr1	SALK_022530.15.95.x	Exon
			SALKseq_030899.1	300-UTR3
Spar-miR397b	ath-MIR397b	Chr4	SALK_072720.19.20.x	Exon
Spar- miR408b / 408c	ath-MIR408	Chr2	SALK_023586.22.40.x	Exon
			GABIseq_497G12.1	Exon
			SALKseq_081087.0	300-UTR5

Légende : En vert, lignées avec homozygote ; en bleu celles dont le gène sauvage n'a pas pu être amplifié ; en orange celles n'ayant qu'un individu hétérozygote.

leur fonds génétique en condition contrôle et/ou en condition de stress. Pour une puissance statistique suffisante, une vingtaine de graines par boîte ont été semées à chaque fois.

2) Sélection des lignées T-DNA hypersensibles et tolérantes

En fonction du caractère hétérozygote ou homozygote des lignées T-DNA commandées, il est possible d'observer respectivement plus ou moins de variabilité des phénotypes au sein d'un lot de graines issues des mutants. En effet, avec des graines issues d'hétérozygotes, il est souvent observé trois catégories de phénotypes réparties selon les proportions mendéliennes telles que suit (**fig. 10**) : $\frac{1}{4}$ de plantules au phénotype similaires au fonds génétique, $\frac{1}{4}$ de plantules significativement différentes et $\frac{1}{2}$ avec un phénotype intermédiaire distinct des deux autres. Dans le cas où cette répartition des phénotypes est observée, il est probable que les deux allèles co-dominant du gène participent aux phénotypes observés et que les proportions des 3 groupes entre eux soient directement liées à la répartition des allèles lors de la fécondation.

Un criblage phénotypique primaire a donc été réalisé sur un échantillon de 20 graines par lot de graines issues de parents hétérozygotes afin de s'assurer que des mutants homozygotes soient testés et puissent présenter un phénotype significativement différent de l'écotype sauvage. Lorsque plusieurs plantules présentaient un phénotype contrasté, leur génotypage a été effectué, dans le cas contraire si aucun phénotype particulier n'a été identifié, ces lignées ont été abandonnées. Les individus homozygotes ont été cultivés pour récolter leurs graines et ainsi constituer une banque de graines 100% homozygotes pour confirmer le phénotype précédemment identifié.

3) Confirmation de l'insertion du T-DNA par PCR

Pour chacune des lignées mutantes, l'insertion du fragment T-DNA dans le locus d'intérêt est vérifiée par PCR pour chaque extraits d'ADN, afin de vérifier que toutes les copies du gène sont mutées et donc que l'individu est homozygote pour l'insertion en question. Les individus homozygotes ont été maintenus en culture pour la production de graines, et un individu hétérozygote a également été conservé pour chaque lignée afin de conserver la lignée du mutant T-DNA si la double mutation est létale ou induit la stérilité. Le **Tableau V** indique les lignées *MIR* pour lesquelles au moins individu mutant homozygote a été identifié. Au total, des graines homozygotes ont été obtenues pour 18 lignées *MIR* sur 39 initialement retenues, et 13 sur les 17 pour les gènes cibles (non présentés).

4) Analyses phénotypiques des mutants homozygotes

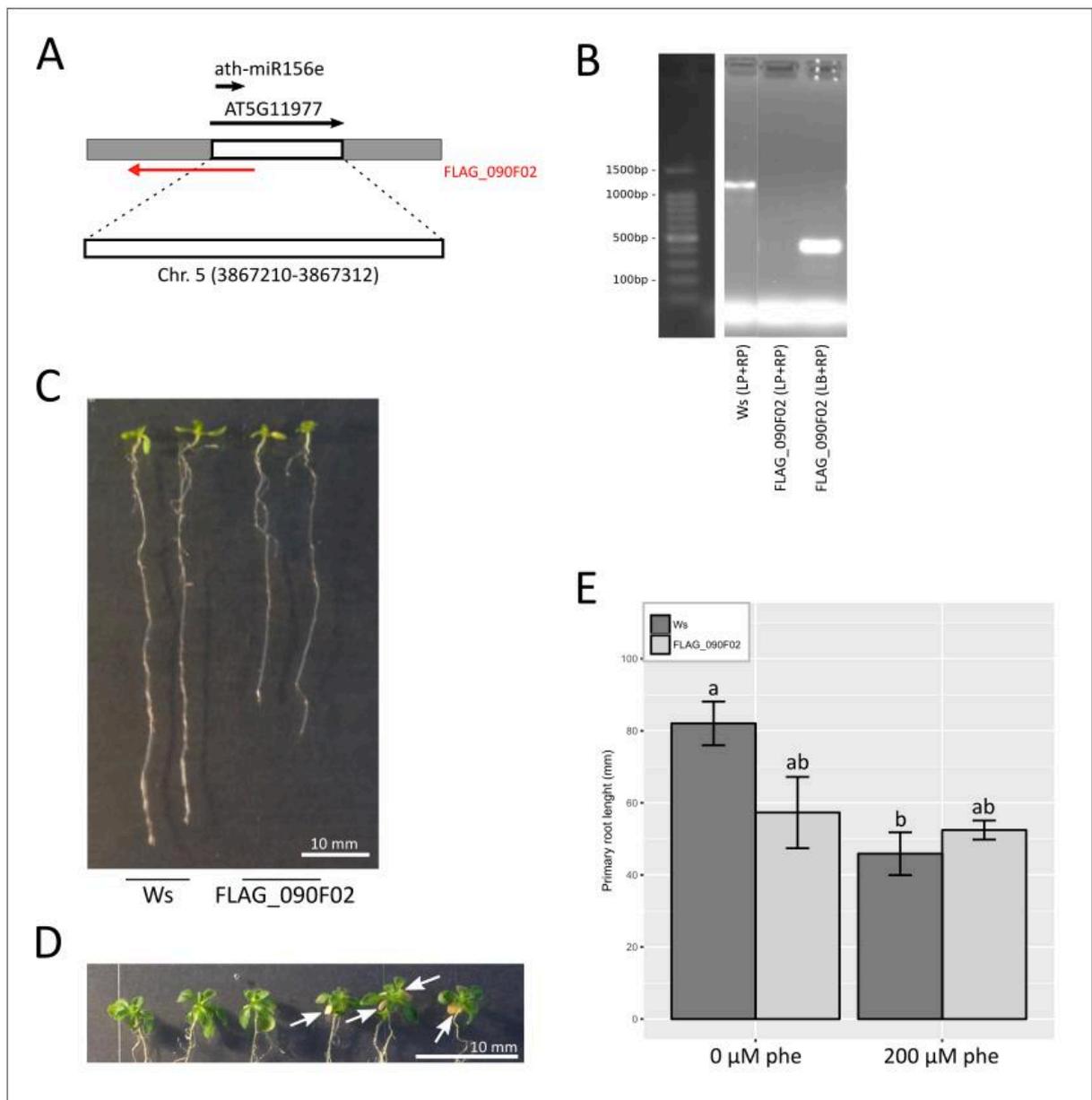


Figure 11 : Analyse fonctionnelle du gène *MIR* AT5G11977 (*ath-miR156e*) en réponse au phénanthrène.

(A) Schéma du positionnement de l'insertion du fragment T-DNA de la lignée FLAG 090F02.

(B) Profil du génotype homozygote validé lors de l'électrophorèse.

(C) Effet d'un milieu à 200 μM de phénanthrène après 1 semaine sur la racine primaire de FLAG 090F02 comparée à celle de Ws (milieu de Hoagland + 1% saccharose et 0,8% d'agar).

(D) Effet d'un milieu à 50 μM de phénanthrène après 2 semaines sur l'appareil aérien de FLAG 090F02 comparé à celui de Ws (milieu identique au C) (les flèches blanches indiquent les feuilles chlorosées).

(E) Représentation graphique des différences d'élongation de la racine primaire de FLAG 090F02 et Ws après 1 semaine selon la concentration en phénanthrène du milieu de culture (milieu identique au C) (les barres annotées de lettres différentes sont significativement différentes selon le test de Kruskal-Wallis).

Le phénotypage des mutants T-DNA homozygotes sélectionnés a été réalisé sur l'ensemble des gènes *MIR* et cibles d'intérêts. Seuls les mutants *MIR* pour lesquels un phénotype contrasté a été identifié sont présentés ci-dessous. Pour les mutants des gènes cibles, aucune différence significative de la croissance de la racine primaire n'a été observée.

La lignée FLAG 090F02 s'est distinguée des autres lors des premières comparaisons phénotypiques, cette lignée présente une insertion d'un fragment T-DNA au niveau d'un exon du gène AT5G11977 de la région codant le ath-MIR156e homologue des gènes Spar-miR156e et Spar-miR156j (**fig. 11 A**), le génotype homozygote de l'individu homozygote a été vérifié par PCR (**fig. 11 B**). Après une semaine de développement en condition contrôle, la lignée a présenté un phénotype similaire à son fonds génétique (Ws) dans les mêmes conditions, ce qui facilite donc l'interprétation des phénotypes en condition de stress. Après une semaine sur un milieu contenant une faible concentration de PHE (50 μ M) et lors d'expériences indépendantes, ce mutant a présenté le même développement de la racine primaire que le sauvage (une légère réduction, données non présentées). Cependant, lorsque le temps de croissance a été prolongé jusqu'à deux semaines, entre une et plusieurs feuilles par plantule ont présenté un état de chlorose avancée (**fig. 11 D**). De plus, lors d'un test sur un milieu contenant une concentration plus élevée en PHE (200 μ M), le mutant FLAG 090F02 a présenté une réduction significative de la taille de sa racine principale dès la première semaine par rapport à Ws (**fig. 11 C**). Au vu de ces résultats le mutant FLAG 090F02 semblait alors être plus sensible que Ws.

Cependant, le phénotype de ce mutant en condition contrôle a toujours été très variable, et au cours des dernières expérimentations menées, il est finalement apparu qu'après une semaine la croissance de sa racine primaire n'est pas significativement réduite par rapport celle de Ws (**fig. 11 E**). De plus, après une semaine de développement sur un milieu à 200 μ M de PHE, FLAG 090F02 n'a cette fois-ci pas été significativement affecté (**fig. 11 E**), contrairement à Ws qui a vu sa croissance racinaire réduire significativement. Ainsi lors de ce dernier phénotypage, le mutant présente un phénotype intermédiaire aux deux extrêmes présentés par Ws et ne s'en distingue pas (voir **fig. 11 E**).

Le mutant SALKseq 071642 porte une mutation dans la séquence génique codant un potentiel miARN d'Arabidopsis (jusqu'à là non caractérisé dans les bases de données), qui est aussi homologue des mêmes gènes Spar-miR156e et Spar-miR156j. Le précurseur de ce miARN appartenant à la famille *MIR156* est intégré dans une séquence antisens annotée ARN long non codant (lncARN) chez Arabidopsis (AT2G33815). Chez Arabidopsis, ce miARN

ciblerait le transcrit du gène squamosa SPL3 (« Squamosa Promoter binding protein-Like » ; AT2G33810) se trouvant sur le brin sens complémentaire (voir séquences en rouge **fig. 12 A et 12 B**). Ainsi, par l'insertion du fragment T-DNA (environ 7kb) à ce locus, le gène *MIR* potentiel d'Arabidopsis devrait être éteint tout comme devrait l'être le gène cible du brin complémentaire. Cependant la région du brin où est inséré le fragment T-DNA n'étant pas annotée comme un gène *MIR*, il n'y a pas d'information disponible sur la région du site d'insertion.

L'individu ayant produit les graines utilisées a été validé comme étant un mutant homozygote par PCR (**fig. 12 C**). Après une semaine de croissance en condition contrôle, le phénotype d'élongation de la racine primaire du mutant SALKseq 071642 n'est pas significativement différent de celui de son fond génétique Col-0 (**fig. 12 E**). Cependant, après une semaine sur un milieu à 200 μ M de PHE, la racine primaire du mutant est significativement plus développée que celle de l'écotype sauvage (**fig. 12 D, E**).

Le mutant SAIL 770G05 présente une insertion dans l'exon du gène ath-miR159b, l'homologue du gène Spar-miR159d. Les individus ayant produit les graines ont été confirmés comme étant des mutants homozygotes par PCR (données non présentées). En condition contrôle, les phénotypes racinaires du mutant n'est pas significativement différent de celui de Col-0 (**fig. 13**), il est affecté par le stress mais se développe significativement plus que Col-0 en condition de stress à 200 μ M de PHE.

III) Utilisation d'une nouvelle stratégie pour l'analyse fonctionnelle des miARNs

L'utilisation des miPEPs (peptides codés par les pre-miARNs et inducteurs d'expression spécifiques des gènes *MIR* correspondant) est une stratégie opposée à celle de l'utilisation des mutants T-DNA. En effet, cette méthode permet de tester la capacité de tolérance dans des conditions d'induction de l'expression des gènes *MIR* d'intérêts et non de pas de répression. Les plants ont été transférés sur milieu avec des concentrations élevées de PHE (200 μ M) et traité avec les miPEPs un jour sur deux pendant une semaine. 4 réplicats techniques ont été réalisés pour les traitements miPEP retenus après un premier essai, soient les miPEPs 156e, 159b, 395d. Les graphiques représentant les résultats du test statistique de Kruskal-Wallis sont présentés en parallèle des photographies d'individus contrôles associés aux individus représentatifs de chaque traitement **figure 14**. Les 3 traitements ont significativement augmenté la croissance de la racine primaire des plantules de Col-0 par rapport aux témoins.

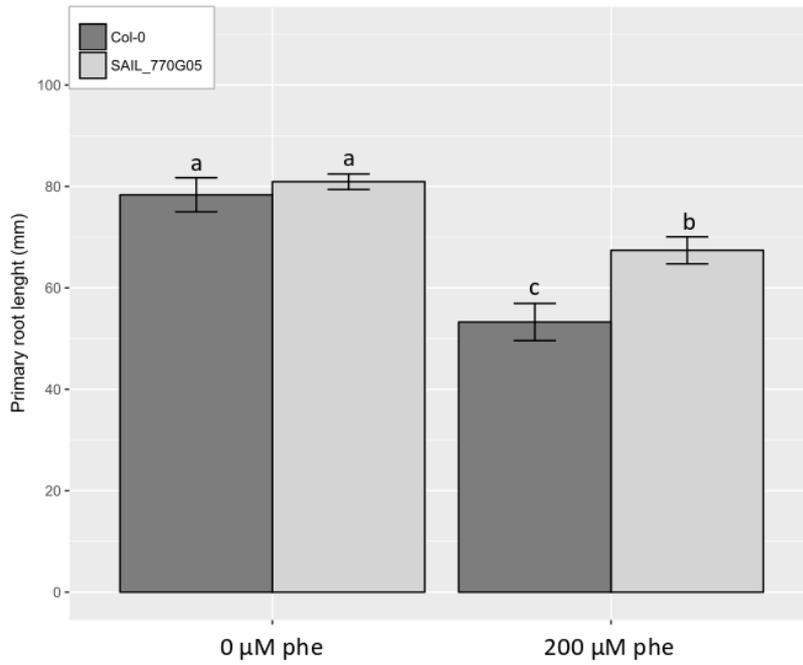


Figure 13 : Représentation graphique des différences d'élongation de la racine primaire de SAIL 770G05 et Col-0 après 1 semaine selon la concentration en phénanthrène du milieu de culture (Hoagland + 1% saccharose et 0,8% d'agar) (les barres annotées de lettres différentes sont significativement différentes selon le test de Kruskal-Wallis).

Discussion

La tolérance aux stress est un processus complexe qui permet aux espèces de surmonter des contraintes environnementales. Certaines composantes physiologiques, biochimiques et moléculaires de cette tolérance devraient être conservées au cours de l'évolution. Dans ce projet, l'hypothèse de départ est que les miARNs séquencés chez les quatre espèces de spartines en présence d'un stress abiotique provoqué par le PHE jouent le même rôle chez d'autres espèces. Des miARNs conservés entre espèces ont donc été sélectionnés pour l'analyse fonctionnelle en système hétérologue chez *A. thaliana*. Un travail de mise au point technique et méthodologique a dû être réalisé.

En premier lieu, la validation des changements d'expression des miARNs obtenus par séquençage a été effectuée. Les couples d'amorces créés pour la RT-qPCR ont amplifié spécifiquement les ADNc des miARNs voulus dans la majorité des cas. Les efficacités optimales théoriques en qPCR sont de 2, une variation trop importante par rapport à cette moyenne a été observée, et peut être due à un mauvais appariement ou à des inhibiteurs contenus dans l'échantillon. La dilution des échantillons a effectivement permis d'optimiser les réactions d'amplification. Néanmoins, il aurait pu être possible d'améliorer les efficacités en réalisant une purification des solutions d'ADNc en colonne de silice. Seul le profil de Sparnew_miR_236 obtenu selon la méthode qPCR chez *S. anglica* est contradictoire avec celui des données de séquençage. Cependant, les données recueillies en RT-qPCR pour ce miARN n'ont que très peu de valeur car son efficacité d'amplification est la plus faible (environ 1,5). De nombreux profils de changement d'expression prédits par le séquençage small-RNA ont donc été validés au cours de stage, confirmant par ailleurs la validité des résultats obtenus par l'approche small-RNAseq.

Ainsi, les gènes *MIR* de spartines dont les profils d'expressions varient par l'effet du stress causé par le PHE ont été présélectionnés, et, ceux ayant des homologues chez *Arabidopsis* ont été retenus. Les écotypes Col-0 et Ws présentent des phénotypes similaires en condition contrôle et voient tout deux leur croissance réduire significativement sur le milieu de Hoagland contenant une concentration de PHE comprise entre 25 et 300 μ M. Malheureusement, les premiers essais sur le milieu MS/2 ont révélé un phénotype de développement des racines secondaires très important. Le remplacement du milieu MS/2 par celui d'Hoagland a favorisé le développement des racines principales au cours de la première semaine de culture.

La composition particulière du milieu MS/2 pourrait être à l'origine de cette différence, en effet, les nutriments des deux milieux diffèrent en termes de molécules et de concentrations,

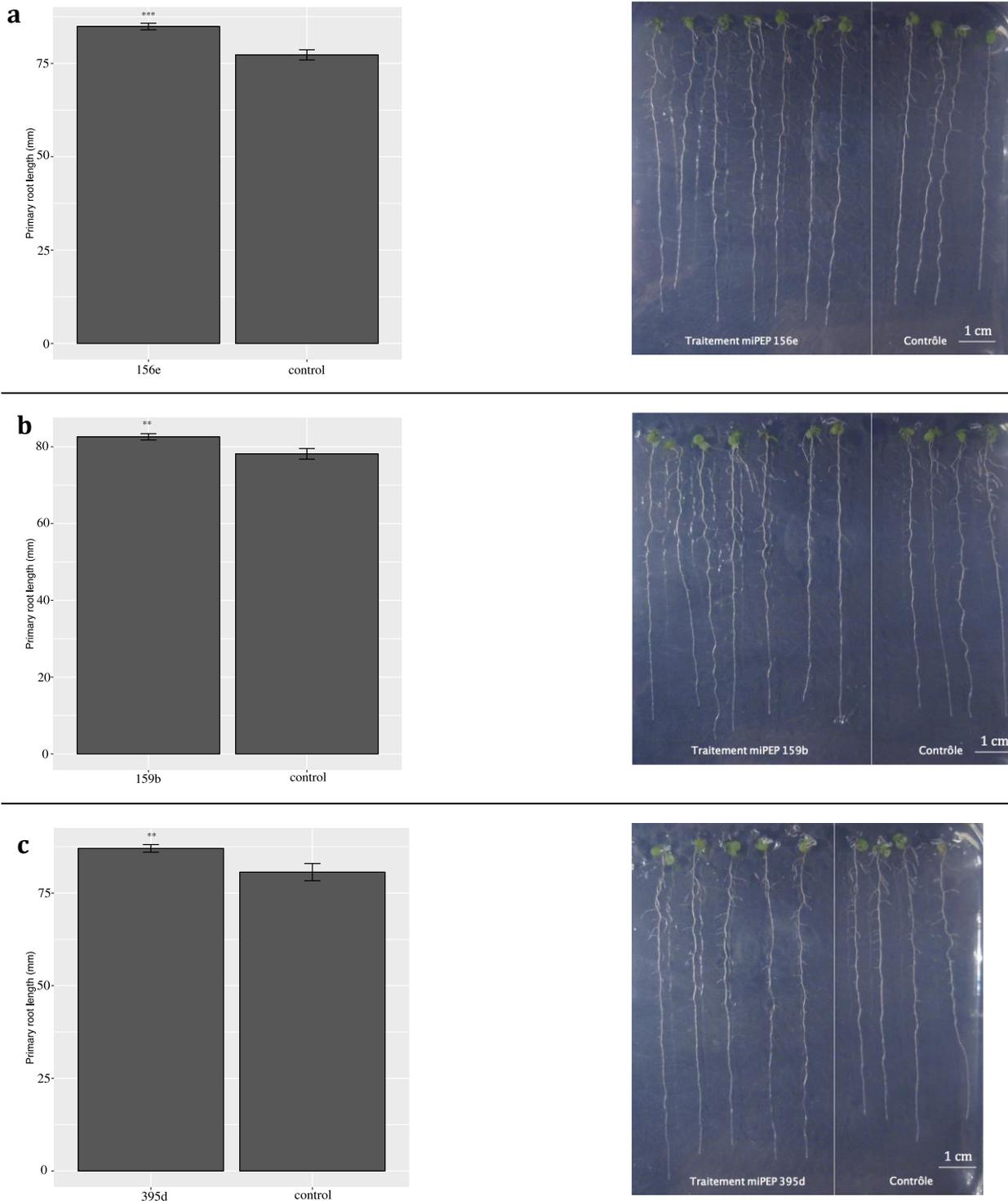


Figure 14 : Résultats de l'expérimentation sur l'effet des miPEP sur des plantules Col-0 exposées 96 heures à un milieu d'une concentration de 200 μ M de phénanthrène (Détail des manipulations présenté dans la partie Résultats).

(a : miPEP 156e, b : miPEP 159b, c : miPEP 395d)

A gauche : Représentation graphique des différences d'élongation de la racine primaire entre plantules Col-0 témoins comparées aux plantules traitées avec les solutions miPEP à 100 μ M. Les barres d'erreurs représentent pour chaque test la valeur de l'erreur standard et les annotations la p-valeur associée (* : $p.val \leq 0,05$; ** : $p.val \leq 0,01$; *** : $p.val \leq 0,001$).

A droite : Photographie des plantules correspondants à l'un des 3 réplicats techniques.

alors que les proportions d'eau et d'agar sont stables, que le pH est ajusté et que les dispositifs expérimentaux ont été strictement les mêmes. En plus de ces différences, les « vitamines de Gamberg » contenues dans le milieu MS/2 utilisé peuvent également expliquer les effets distincts qu'ont les 2 milieux sur l'appareil racinaire des plantules. A titre d'exemple, le myo-inositol qui compose le milieu MS/2 mais pas le milieu de Hoagland est impliqué dans la germination des graines ainsi que dans les réponses à l'auxine et aux stress. Les rapports Carbone sur Azote sont eux-aussi différents. Il est également important de rappeler que du saccharose a été ajouté systématiquement à hauteur d'1% dans les milieux, car il a été constaté qu'il permettait une homogénéisation de la réponse racinaire au stress. Les différentes lignées d'*Arabidopsis* se sont finalement développées de manière attendue sur le milieu de Hoagland, et le contraste 0-200 μM s'est avéré suffisamment important pour observer rapidement l'impact du PHE. Une étude des effets du PHE à des concentrations plus basses aurait été possible si le phénotypage avait été envisagé à plus long terme, jusqu'à l'initiation florale par exemple où les effets des mutations auraient pu mettre en évidence d'autres phénotypes.

Selon les analyses d'expressions différentielles en RT-qPCR, le gène *MIR156e* est significativement sous régulé chez *S. anglica* et *S. x townsendii* en condition de stress par rapport à la condition contrôle (à l'inverse des changements d'expressions des 2 espèces parentales). La mutation de FLAG 090F02 correspond à une mutation qui devrait empêcher l'expression du *MIR156e* et qui a pour effet de réduire (non significativement) la croissance de la racine primaire par rapport aux témoins en condition contrôle. La réduction de croissance constitutive du mutant n'est pas amplifiée à 200 μM de PHE, et semble donc masquer les autres effets que ce traitement a sur le développement de la racine du mutant.

La famille des *MIR156* est très conservée entre les différentes lignées de plantes et cible les SPLs (*Squamosa* Promoter Binding Protein-Like). Ces derniers sont des facteurs de transcription impliqués dans le développement des plantes, notamment dans les transitions de la phase végétative juvénile à la phase végétative adulte puis à la phase d'induction florale, ainsi que dans le développement des trichomes (Yu et al., 2010 ; Gou et al., 2011) et la biosynthèse d'anthocyanine (Gou et al., 2011). Les miARNs 156 au nombre de 8 chez *A. thaliana* sont pour partie redondants, les 6 premiers (a-f) sont en tout point identiques et les 2 derniers (h-g) ne sont différenciés respectivement que par une et deux substitutions (Jones-Rhoades & Bartel, 2004). Ces miARNs sont très fortement exprimés aux stades juvéniles, leur abondance décroît lorsque l'appareil aérien d'*A. thaliana* se développe ; ils réduisent la capacité de la plante à produire des racines secondaires en réprimant localement l'expression des SPLs (Xu et al., 2016). Cela pourrait expliquer l'effet de la mutation de FLAG 090F02 qui réprime le

développement de la racine primaire aussi efficacement que le sauvage en condition contrôle. Cette incohérence entre ce trait phénotypique de FLAG 090F02 et les données acquises sur les spartines pourrait donc s'expliquer par le fait que les spartines séquencées n'étaient pas à un stade de développement aussi précoce que les mutants de cette étude. De plus, les niveaux d'expressions ont été évalués dans les feuilles de spartines, et non pas dans l'appareil racinaire. Cependant, le PHE semble avoir eu un autre impact sur le phénotype du mutant lors des premiers tests, l'apparition de chloroses précoces.

Les SPLs, par le contrôle des *MIR156*, seraient également impliqués dans la réponse aux stress abiotiques telles les résistances au cuivre et au cadmium (Gielen et al., 2016), les réponses au phosphate (Lei et al., 2016), la thermotolérance (Chao et al., 2017) et la différenciation des trichomes foliaires adaxiaux couplée à une régulation locale de la synthèse des flavonoïdes (Gou et al., 2011). La surexpression des *MIR156* induit une croissance de trichomes ectopiques sur la tige d'*Arabidopsis*, et les plantes présentant le phénotype inverse de surexpression des SPLs en présentent moins. Les trichomes adaxiaux semblent être impliqués dans des processus de détoxification, dont celle du PHE (Dumas et al., 2016). L'inactivation de l'expression des *MIR156* induit l'accumulation de flavanol, et leur augmentation celle d'anthocyanine (Gou et al., 2011), une molécule impliquée dans la résistance aux stress biotiques et dans la protection aux UVs. L'anthocyanine et les trichomes devraient donc être affectés négativement dans leur production par la mutation. La réaction d'hypersensibilité localisée près des trichomes adaxiaux d'*Arabidopsis* liée au PHE et les chloroses précoces de FLAG 090F02 pourraient donc trouver une explication dans un processus de détoxification inefficace localisé près des trichomes. Les impacts du PHE sur les voies de signalisation des stress biotiques et abiotiques pourraient donc trouver une origine dans l'expression des *MIR156* et des SPLs.

Les séquences des Spar-miR156e/j sont très proches (2 mésappariements) de celle du *MIR156* potentiel (AT2G33815), il est donc envisageable de comparer les résultats acquis en RT-qPCR sur le premier aux données obtenues sur le mutant SALKseq 071642 d'*Arabidopsis* de l'ARNInc (homologue aux *MIR156* de spartines). Le phénotype de ce mutant n'est pas statistiquement différent de celui de l'écotype en condition contrôle et il n'est pas affecté par le traitement à 200 μ M de PHE. Si l'expression de ce potentiel gène *MIR* est diminuée, celle du gène cible SPL3 devrait augmenter. Etant donné que le mutant FLAG 090F02 pourrait lui aussi réprimer post-transcriptionnellement l'expression de ce gène SPL3, les phénotypes des 2 mutants peuvent paraître contradictoires. Il se trouve que la mutation SALKseq 071642 pourrait

également affecter le gène cible prédit sur le brin complémentaire de la région de l'insertion du fragment T-DNA. En effet, si l'expression du gène SPL3 est réduite par l'insertion du fragment T-DNA, alors les deux profils observés chez ces mutants concordent.

Le mutant SAIL 770G05 présente quant à lui un phénotype équivalent à l'écotype sauvage sur le milieu contrôle, mais il est moins affecté en condition de stress induit par le stress à 200 μ M PHE. Sa mutation est située dans l'exon du gène *MIR159b* d'*Arabidopsis* homologues du gène Spar-miR159d. Sa différence d'expression en comparaison intra espèce n'est pas significative, mais en condition de stress PHE son expression est réduite chez *S. anglica* et *S. x townsendii* par rapport à la Mid-Parent Value (MPV : expression moyenne des espèces parentales sous l'hypothèse d'additivité chez l'hybride ou l'allopolyplöïde). Selon les GO Termes (Gene Ontologie) et les annotations des gènes cibles associés à Spar-miR159d, il ciblerait des CYP450 (Cytochrome-P450) chez *Spartina*. C'est protéines sont impliquées dans la détoxification des xénobiotiques, et la prise en charge des ROS, que ce soit chez les plantes ou chez les animaux. Cependant chez *Arabidopsis*, le ath-miR159b cible spécifiquement les facteurs MYB33 et MYB65, mais selon **Allen et al. (2010)**, les mutations de *MIR159a* et *MIR159b* qui sont redondants ont peu d'effet sur le phénotype, même en double KO. Les résultats actuels sont donc une mise en évidence d'un premier véritable impact de la mutation seule. De plus, le miARN159b pourrait cibler les SPLs, donc la mutation de SAIL 770G05 pourrait avoir un effet sur le développement d'*Arabidopsis* atténué mais néanmoins similaire à celui des mutants FLAG 090F02 et SALKseq 071642.

Avec les traitements miPEP 156e et 159b, une augmentation de l'expression des gènes *MIR* correspondant est attendue, et par conséquent les niveaux d'expression de leurs gènes cibles seraient réduits, dont ceux des SPLs (**Couzigou et al., 2015**). Les traitements ont effectivement augmenté significativement l'élongation de la racine primaire sur un milieu à 200 μ M par rapport aux contrôles. L'étude n'a cependant pas été réalisée sur un milieu contrôle et les témoins n'ont pas été traités avec une quantité équivalente d'eau ultra pure. L'effet du miPEP 156e est cependant bien inverse à celui de FLAG 090F02 et corrobore les hypothèses formulées sur le développement de sa racine primaire. Dans la même logique et puisque aucune chlorose n'a été observée sur les feuilles de ces plantules traitées, il semblerait que la différenciation de l'épiderme foliaire ait été impactée de manière inverse par rapport au mutant. Dans le cadre de l'hypothèse d'un impact négatif de la mutation de SALKseq 071642 sur l'expression du gène SPL3, l'effet du traitement appuie également l'impact de SPL3 dans le développement de la racine primaire en condition de stress PHE.

Conclusion et Perspectives

Les travaux réalisés au cours de ce stage ont permis (1) de mettre au point un protocole de quantification relative des miARNs de spartines, (2) de valider par qPCR les changements d'expression de certains gènes *MIR* chez *Spartina* en réponse au phénanthrène, (3) de produire un stock de graines mutantes homozygotes de locus d'intérêts dans l'étude de la tolérance au phénanthrène, (4) d'aborder l'approche d'une validation fonctionnelle par les miPEPs, (5) de mettre en évidence l'implication des gènes *MIR156* et *MIR159* sur le développement d'*A. thaliana* en condition de stress de phénanthrène, et (6) d'identifier l'effet d'un potentiel gène *MIR156* non annoté chez *Arabidopsis* et/ou celui de *SPL3*.

Afin d'approfondir cette étude il sera nécessaire (1) de valider davantage de changements d'expression des gènes *MIR* chez *Spartina* en réponse au phénanthrène, (2) de prendre en compte les différences d'expression interspécifiques, (3) de confirmer l'effet des mutations observées par l'étude sur d'autres mutants T-DNA pour les gènes *MIR156* et *SPLs*, sur des mutants de surexpression, d'un mutant double KO des gènes *MIR159a* et *MIR159b*, (4) de valider le traitement de miPEPs avec des plantes témoins, et (5) d'observer en détail la localisation du phénanthrène et son effet dans les feuilles du mutant FLAG 090F02.

Bibliographie

- Ainouche M, Chelaifa H, Ferreira J, Bellot S, Ainouche A, Salmon A** (2012) Erratum From— Polyploid Evolution in *Spartina*: Dealing with Highly Redundant Hybrid Genomes. In PS Soltis, DE Soltis, eds, Polyploidy and Genome Evolution. Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg, pp 225–243
- Ainouche ML, Baumel A, Salmon A, Yannic G** (2003) Hybridization, polyploidy and speciation in *Spartina* (Poaceae). *New Phytologist* **161**: 165–172
- Ainouche ML, Fortune PM, Salmon A, Parisod C, Grandbastien M-A, Fukunaga K, Ricou M, Misset M-T** (2009) Hybridization, polyploidy and invasion: lessons from *Spartina* (Poaceae). *Biological Invasions* **11**: 1159–1173
- Alkio M, Tabuchi TM, Wang X, Colón-Carmona A** (2005) Stress responses to polycyclic aromatic hydrocarbons in Arabidopsis include growth inhibition and hypersensitive response-like symptoms. *Journal of Experimental Botany* **56**: 2983–2994
- Allen RS, Li J, Alonso-Peral MM, White RG, Gubler F, Millar AA** (2010) MicroR159 regulation of most conserved targets in Arabidopsis has negligible phenotypic effects. *Silence* **1**: 18
- Alonso JM, Stepanova AN, Lisse TJ, Kim CJ, Chen H, Shinn P, Stevenson DK, Zimmerman J, Barajas P, Cheuk R, et al** (2003) Genome-wide insertional mutagenesis of *Arabidopsis thaliana*. *Science* **301**: 653–657
- Carthew RW, Sontheimer EJ** (2009) Origins and Mechanisms of miRNAs and siRNAs. *Cell* **136**: 642–655
- Chao L-M, Liu Y-Q, Chen D-Y, Xue X-Y, Mao Y-B, Chen X-Y** (2017) Arabidopsis Transcription Factors SPL1 and SPL12 Confer Plant Thermotolerance at Reproductive Stage. *Molecular Plant* **10**: 735–748
- Chelaifa H, Monnier A, Ainouche M** (2010) Transcriptomic changes following recent natural hybridization and allopolyploidy in the salt marsh species *Spartina* × *townsendii* and *Spartina anglica* (Poaceae). *New Phytologist* **186**: 161–174
- Comai L** (2005) The advantages and disadvantages of being polyploid. *Nature Reviews Genetics* **6**: 836–846
- Couzigou J-M, Laouressgues D, Bécard G, Combiér J-P** (2015) miRNA-encoded peptides (miPEPs): A new tool to analyze the roles of miRNAs in plant biology. *RNA Biology* **12**: 1178–1180
- Dumas A-S, Tacconat L, Barbas E, Rigail G, Catrice O, Bernard D, Benamar A, Macherel D, El Amrani A, Berthomé R** (2016) Unraveling the early molecular and physiological mechanisms involved in response to phenanthrene exposure. *BMC Genomics*
- Edwards R, Dixon DP, Cummins I, Brazier-Hicks M, Skipsey M** (2011) New Perspectives on the Metabolism and Detoxification of Synthetic Compounds in Plants. In P Schröder, CD Collins, eds, *Organic Xenobiotics and Plants*. Springer Netherlands, Dordrecht, pp 125–148
- Fleeger J, Carman K, Riggio M, Mendelssohn I, Lin Q, Hou A, Deis D, Zengel S** (2015) Recovery of salt marsh benthic microalgae and meiofauna following the Deepwater Horizon oil spill linked to recovery of *Spartina alterniflora*. *Marine Ecology Progress Series* **536**: 39–54
- Gielen H, Remans T, Vangronsveld J, Cuypers A** (2016) Toxicity responses of Cu and Cd: the involvement of miRNAs and the transcription factor SPL7. *BMC Plant Biology*
- Gou J-Y, Felippes FF, Liu C-J, Weigel D, Wang J-W** (2011) Negative Regulation of Anthocyanin Biosynthesis in *Arabidopsis* by a miR156-Targeted SPL Transcription Factor. *The Plant Cell* **23**: 1512–1522
- Guo H, Ingolia NT, Weissman JS, Bartel DP** (2010) Mammalian microRNAs predominantly act to decrease target mRNA levels. *Nature* **466**: 835–840

- Haritash AK, Kaushik CP** (2009) Biodegradation aspects of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs): A review. *Journal of Hazardous Materials* **169**: 1–15
- Jones-Rhoades MW, Bartel DP** (2004) Computational Identification of Plant MicroRNAs and Their Targets, Including a Stress-Induced miRNA. *Molecular Cell* **14**: 787–799
- Kasajima I, Ide Y, Ohkama-Ohtsu N, Hayashi H, Yoneyama T, Fujiwara T** (2004) A protocol for rapid DNA extraction from *Arabidopsis thaliana* for PCR analysis. *Plant Molecular Biology Reporter* **22**: 49–52
- Kästner M, Breuer-Jammali M, Mahro B** (1998) Impact of inoculation protocols, salinity, and pH on the degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) and survival of PAH-degrading bacteria introduced into soil. *Appl Environ Microbiol* **64**: 359–362
- Khraiwesh B, Zhu J-K, Zhu J** (2012) Role of miRNAs and siRNAs in biotic and abiotic stress responses of plants. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Gene Regulatory Mechanisms* **1819**: 137–148
- Lauressergues D, Couzigou J-M, Clemente HS, Martinez Y, Dunand C, Bécard G, Combier J-P** (2015) Primary transcripts of microRNAs encode regulatory peptides. *Nature* **520**: 90–93
- Lei J, Sun Y** (2014) miR-PREFeR: an accurate, fast and easy-to-use plant miRNA prediction tool using small RNA-Seq data. *Bioinformatics* **30**: 2837–2839
- Lei K-J, Lin Y-M, Ren J, Bai L, Miao Y-C, An G-Y, Song C-P** (2016) Modulation of the Phosphate-Deficient Responses by MicroRNA156 and its Targeted SQUAMOSA PROMOTER BINDING PROTEIN-LIKE 3 in *Arabidopsis*. *Plant and Cell Physiology* **57**: 192–203
- Lin Q, Mendelssohn IA, Graham SA, Hou A, Fleeger JW, Deis DR** (2016) Response of salt marshes to oiling from the *Deepwater Horizon* spill: Implications for plant growth, soil surface-erosion, and shoreline stability. *Science of The Total Environment* **557–558**: 369–377
- Love MI, Huber W, Anders S** (2014) Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2. *Genome Biology*.
- Marchant CJ** (1963) Corrected Chromosome Numbers for *Spartina × townsendii* and its Parent Species. *Nature* **199**: 929–929
- Mrozik A, Piotrowska-Seget Z, Labuzek S** (2003) Bacterial Degradation and Bioremediation of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons. *Polish Journal of Environmental Studies*, 12(1).
- Pandey R, Joshi G, Bhardwaj AR, Agarwal M, Katiyar-Agarwal S** (2014) A Comprehensive Genome-Wide Study on Tissue-Specific and Abiotic Stress-Specific miRNAs in *Triticum aestivum*. *PLoS ONE* **9**: e95800
- Pennings S-C & Bertness M-D** (2001). Salt marsh communities. *Marine community ecology*, 289-316
- Pfaffl MW** (2001) A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res* **29**: e45
- R Core Team 2018**
- Risso D, Schwartz K, Sherlock G, Dudoit S** (2011) GC-Content Normalization for RNA-Seq Data. *BMC Bioinformatics* **12**: 480
- Rychen, G., Ducoulombier-Crépineau, C., Grova, N., Jurjanz, S., & Feidt, C** (2005) Modalités et risques de transfert des polluants organiques persistants vers le lait. *PRODUCTIONS ANIMALES-PARIS-INSTITUT NATIONAL DE LA RECHERCHE AGRONOMIQUE-*, 18(5), 355.
- Samanta SK, Singh OV, Jain RK** (2002) Polycyclic aromatic hydrocarbons: environmental pollution and bioremediation. *Trends in Biotechnology* **20**: 243–248
- Shi R, Sun Y-H, Zhang X-H, Chiang VL** (2012) Poly(T) Adaptor RT-PCR. In J-B Fan, ed, *Next-Generation MicroRNA Expression Profiling Technology*. Humana Press, Totowa, NJ, pp 53–66

- Shiri M, Rabhi M, Abdelly C, El Amrani A** (2015) The halophytic model plant *Thellungiella salsuginea* exhibited increased tolerance to phenanthrene-induced stress in comparison with the glycophytic one *Arabidopsis thaliana*: Application for phytoremediation. *Ecological Engineering* **74**: 125–134
- Strong D-R & Ayres D-A** (2009) *Spartina* introductions and consequences in salt marshes. Human impacts on salt marshes: a global perspective. University of California Press, Berkeley and Los Angeles, 3-22
- Thompson JD** (1991) The Biology of an Invasive Plant. *BioScience* **41**: 393–401
- Vandermeersch G, Lourenço HM, Alvarez-Muñoz D, Cunha S, Diogène J, Cano-Sancho G, Sloth JJ, Kwadijk C, Barcelo D, Allegaert W, et al** (2015) Environmental contaminants of emerging concern in seafood – European database on contaminant levels. *Environmental Research* **143**: 29–45
- Weisman D, Alkio M, Colón-Carmona A** (2010) Transcriptional responses to polycyclic aromatic hydrocarbon-induced stress in *Arabidopsis thaliana* reveal the involvement of hormone and defense signaling pathways. *BMC Plant Biology* **10**: 59
- Wendel JF, Jackson SA, Meyers BC, Wing RA** (2016) Evolution of plant genome architecture. *Genome Biology*
- Xu M, Hu T, Zhao J, Park M-Y, Earley KW, Wu G, Yang L, Poethig RS** (2016) Developmental Functions of miR156-Regulated SQUAMOSA PROMOTER BINDING PROTEIN-LIKE (SPL) Genes in *Arabidopsis thaliana*. *PLOS Genetics* **12**: e1006263
- Yamada K** (2003) Empirical Analysis of Transcriptional Activity in the *Arabidopsis* Genome. *Science* **302**: 842–846
- Yu S, Galvão VC, Zhang Y-C, Horrer D, Zhang T-Q, Hao Y-H, Feng Y-Q, Wang S, Schmid M, Wang J-W** (2012) Gibberellin regulates the *Arabidopsis* floral transition through miR156-targeted SQUAMOSA promoter binding-like transcription factors. *Plant Cell* **24**: 3320–3332
- Zhang RS, Shen YM, Lu LY, Yan SG, Wang YH, Li JL, Zhang ZL** (2004) Formation of *Spartina alterniflora* salt marshes on the coast of Jiangsu Province, China. *Ecological Engineering* **23**: 95–105