

**Ecole doctorale Environnements-Santé**  
**Dossier de projet de thèse « Contrat doctoral Etablissements »**  
**ANNEE 2024**

**TITRE DU PROJET :** ... Implication des stérols dans la réponse de la tomate à différentes interactions avec des champignons racinaires .....

**1) Renseignements administratifs sur la direction de thèse (1 page maximum) :**

Directeur de thèse HDR :  
Nom : Gerbeau-Pissot  
Prénom : Patricia

**2) Descriptif du projet de thèse (devra inclure les rubriques suivantes) :**

▪ **Nom et label de l'unité de recherche (ainsi que l'équipe interne s'il y a lieu)**

Equipe « Santé des plantes : Défense et mycorhize » ; Pôle Interactions Plantes-Microorganismes, UMR 1347 Agroécologie, Institut Agro Dijon/INRAe/Université de Bourgogne

▪ **Localisation**

Centre INRAe, Rue Sully, Dijon

▪ **Nom du directeur de thèse et du co-directeur s'il y a lieu**

Patricia Gerbeau-Pissot

▪ **Adresse courriel du contact scientifique**

[Patricia.Gerbeau-Pissot@u-bourgogne.fr](mailto:Patricia.Gerbeau-Pissot@u-bourgogne.fr)

▪ **Description du projet (2 pages maximum)**

Au cours de leurs 4 à 5 cents millions d'années d'évolution, les plantes ont optimisé une réponse adaptative leur permettant de faire face aux stress, biotiques ou abiotiques, auxquels elles sont continuellement soumises. La connaissance approfondie des mécanismes de réponse mis en œuvre, comme la signalisation précocement induite pour déclencher spécifiquement les dits mécanismes, devient alors un pré-requis indispensable pour satisfaire les enjeux actuels d'une agriculture plus respectueuse de l'environnement.

Contexte scientifique et thématique du laboratoire

Dans ces réponses, la membrane plasmique (MP) joue un rôle essentiel. Elle forme une barrière sélective entre la cellule et le milieu extérieur. C'est aussi un senseur des modifications environnementales et une plateforme orchestrant la transduction du signal permettant de déployer une réponse adaptée aux *stimuli* perçus<sup>(1; 2; 3)</sup>. La structure de base de la MP, établie au travers du modèle de la « mosaïque fluide », est une bicouche de lipides dans laquelle des protéines sont insérées ou associées de diverses manières. Les grandes classes de lipides sont conservées au travers des règnes mais les plantes présentent des particularités importantes telles que plusieurs espèces moléculaires de stérols, libres ou conjugués. L'hétérogénéité de la répartition spatiale des composants de la MP et le lien entre cette organisation, sa dynamique et la signalisation ont récemment émergé comme une donnée essentielle en biologie cellulaire. Chez les plantes, la **dynamique de cette organisation a été particulièrement documentée au cours des étapes précoces de l'interaction plante-pathogène** (signalisation de défense<sup>(4; 5)</sup>), mais **jamais lors de l'interaction plante-champignon mycorhizien**. Ainsi, nous avons montré, sur fractions membranaires purifiées et sur cellules cultivées en suspensions, que les stérols s'associaient à d'autres composants de la MP, de manière dynamique, pour former des domaines qui montrent conséquemment un état d'ordre de leur agencement plus important<sup>(1; 2)</sup>. Nous avons vérifié *in vivo* que la membrane plasmique des cellules végétales exposait à sa surface une mosaïque de ces

domaines ordonnés et que leur abondance était modifiée en réponse à l'exposition à des éliciteurs de défense<sup>(4:5)</sup>, proposant ainsi que la théorie de « radeaux membranaires » évoquée dans les cellules animales puisse être validée chez les végétaux<sup>(6)</sup> et que ceux-ci pourraient être des acteurs clés de la réponse adaptative. Notre hypothèse de travail est que les signaux échangés lors de la mise en place de la symbiose mycorhizienne à arbuscules (SMA) conduiraient à une modification de la composition, et donc *in fine* de l'organisation membranaire, commune ou différente à celle de l'interaction plante-pathogène, et à une réponse adaptative spécifique. Il est donc nécessaire de comprendre comment la MP assure ses fonctions physiologiques en coordonnant la transduction du signal venant du milieu auquel fait face la cellule, en une réponse opérée par la machinerie cellulaire.

#### Objectifs et stratégies du projet de thèse

Le projet de thèse propose d'utiliser ces acquis méthodologiques afin d'établir un lien fonctionnel entre la structuration de la membrane plasmique et son rôle dans la cascade de signalisation en réponse aux différentes IPM. Nous utiliserons la plante modèle *Solanum lycopersicum* var. Marmande, qui présente l'avantage (i) d'avoir un génome séquencé et (ii) d'être utilisé avec succès pour un certains nombres d'outils moléculaires (développement du CRISPR Cas9, par exemple). Afin de comparer différentes IPM, nous nous focaliserons sur la racine, et observerons les réponses à la mycorhization (2 mois de contact avec *Rhizophagus irregularis* DAOM 197198), au développement de la maladie (infection par *F. oxysporum* For12 f. sp. *radicis lycopersici* et *F. oxysporum* Fo18 f. sp. *lycopersici*, race1, souches pathogènes respectivement responsables de pourriture racinaire ou de trachéomycose et de flétrissement sur tomate) ou de la résistance (exposition préalable de 24h avec *Fusarium oxysporum* Fo47, souche non pathogène capable d'induire un effet priming<sup>(7)</sup>).

- Actuellement, nous manquons de données permettant de décrire de manière précise et complète la composition lipidique (et notamment en stérols) de la MP et ses éventuelles modifications suite à différentes interactions plante-microorganisme (IPM). Afin d'investir cette question, nous engagerons plusieurs approches en parallèle. Des techniques de fractionnement cellulaires, maîtrisées ou à développer au laboratoire, permettront de déterminer la composition en stérols des différents compartiments cellulaires et leur éventuelles modifications suite aux différentes IPM. Nous nous intéresserons plus particulièrement aux fractions : microsomes, PM, gouttelettes lipidiques. L'identification et la caractérisation du mélange en phytostérols se feront par chromatographie gaz couplée à une détection MS et une quantification FID, pour mettre en évidence des variations de la représentativité respective des différents phytostérols. A ce jour, aucune sonde ne permet une reconnaissance fiable et efficace des stérols membranaires, l'obtention d'un tel outil serait un apport majeur pour l'ensemble de la communauté scientifique. La levée de ce frein est un objectif ambitieux et déjà initié dans l'équipe. Ajouté aux approches biochimiques, ce véritable challenge technique sera relevé en collaboration avec des équipes de chimistes (Equipe « Nanochemistry and Bioimaging », A. Klymchenko) qui synthétisent des sondes « à façon », avec lesquelles des discussions sont en cours. Cette sonde ouvrira la porte à de nombreuses approches complémentaires et novatrices pour (i) vérifier la localisation intra-cellulaire des stérols, (ii) suivre de manière dynamique les modifications de leur teneur suite aux IPM induites, et (iii) observer leur flux intra- et extra- cellulaires pendant ces interactions. Enfin, ces données seront corrélées à des données de transcriptomiques obtenues sur l'ensemble des gènes impliqués dans la voie de biosynthèse des stérols.

- L'étude de l'état physique de la MP et de sa réponse à la mise en place des IPM racinaires constituera un second axe du projet de thèse. Il sera caractérisé à l'aide de différentes sondes fluorescentes hydrophobes développées et dont l'utilisation est parfaitement maîtrisée au laboratoire (di4ANEPPDHQ, par exemple<sup>(8)</sup>). Cette approche sera réalisée sur des cultures *in vitro* de manière à (i) utiliser des racines plus jeunes et plus facilement observables en microscopie, (ii) réaliser (et comparer) des suivis des étapes précoces des IPM, et (iii) focaliser nos observations sur les cellules cibles de cette mise en place. Ces approches bénéficieront de la récente mise au point au laboratoire de la technique de transparaissance pour pouvoir accéder et caractériser les couches les plus profondes de la racine<sup>(9)</sup>.

- En parallèle à ces deux volets exploratoires qui permettront de décrire les modifications de la MP en réponse aux IPM racinaires, nous pourrions caractériser le rôle et l'implication des stérols, et donc de la structuration de la MP qui en dépend, dans les différentes voies de signalisation. Afin d'interférer avec la dynamique des propriétés biophysiques (stérol-dépendantes) de la MP et pour évaluer ses répercussions sur la signalisation déclenchée par les IPM, nous déstabiliserons la biosynthèse des stérols (par des approches pharmacologiques et génétiques, CRISPR Cas9 notamment) et en mesurerons les effets sur (i) la composition en stérols et ces modifications induites par les IPM, (ii) les propriétés de la MP et (iii) la mise en place des IPM (réponses précoces et tardives).

#### Originalité du projet

Le projet aspire à poser les bases de la connaissance de la réponse précoce de la cellule (et plus précisément de sa MP) végétale aux IPM racinaires et de définir, dans quelles mesures, celle-ci montrent des divergences ou similitudes. La grande majorité des expériences se feront sur la base de protocoles parfaitement maîtrisés par l'équipe, minimisant les risques, et permettront d'obtenir des données fiables sur la composition en stérols de la

membrane plasmique dans différents contextes d'IPM. Ces données, pionnières, pourront justifier la rédaction d'un article de résultats (la rédaction d'un premier article de revue est envisagée dès le début de la thèse), et poseront les fondements de notre compréhension de la régulation de la localisation des stérols et leur possible implication dans les IPM. Plus globalement, nos résultats devraient fournir une caractérisation inédite de la proportion des différents stérols présents au sein des différents compartiments cellulaires, dont la MP végétale, *in vitro* et *in vivo*, dans un contexte d'IPM. Ces résultats tout à fait novateurs, pourront être mis en regard de l'analyse des propriétés biophysiques de la MP, tout aussi inédite dans la littérature à ce jour, et donner les bases d'une réflexion sur l'implication des stérols membranaires dans les IPM.

### Références

1. Grosjean K. *et al.* (2015) Differential effect of plant lipids on membrane organization: specificities of phytosphingolipids and phytosterols. *J Biol Chem* 290, 5810–5825
2. Grosjean K. *et al.* (2018) Interactions between lipids and proteins are critical for organization of plasma membrane-ordered domains in tobacco BY-2 cells. *J Exp Bot* 69, 3545–3557
3. Mamode Cassim A. *et al.* (2019) Plant lipids: Key players of plasma membrane organization and function. *Prog Lipid Res.* 73, 1-27
4. Gerbeau-Pissot P. *et al.* (2014) Modification of plasma membrane organization in tobacco cells elicited by cryptogein. *Plant Physiol* 164, 273–286
5. Sandor R. *et al.* (2016) Plasma membrane order and fluidity are diversely triggered by elicitors of plant defence. *J Exp Bot* 67, 5173–5185
6. Simon-Plas F. *et al.* (2011) An update on plant membrane rafts. *Curr Opin Plant Biol.* 14,642-9
7. Aimé S. *et al.* (2013) The Endophytic Strain *Fusarium oxysporum* Fo47: A Good Candidate for Priming the Defense Responses in Tomato Roots. *MPMI.* 26, 918-926
8. Gerbeau-Pissot P. *et al.* (2016) Ratiometric Fluorescence Live Imaging Analysis of Membrane Lipid Order in Arabidopsis Mitotic Cells Using a Lipid Order-Sensitive Probe. *Methods Mol Biol.* 1370,227-39
9. Hériché M. *et al.* (2022) Imaging plant tissues: advances and promising clearing practices. *Trends Plant Sci.* 27, 601-615.

#### ▪ **Financement du projet – partie Recherche (montants acquis, type de contrat)**

Au sein du Pôle IPM de l'UMR Agroécologie, les ressources financières sont mutualisées et permettront sans souci de mener à bien les différents travaux de la thèse. De plus, l'équipe d'accueil du/de la doctorant.e vient d'obtenir 2 contrats de recherches REEVES (200 k€) et Protoleg (180 k€) qui débiteront les 1er mars et 1er avril respectivement et ont une durée de 3 ans. Le projet ANR Stetos (365 k€) portant précisément sur les travaux de la thèse est actuellement soumis.

#### ▪ **Connaissances et compétences requises**

Biologie cellulaire et moléculaire, physiologie végétale, une connaissance des interactions plante-microorganisme et des notions sur les techniques d'étude des membranes serait un avantage.

### **Résumé en français et anglais (limité chacun à 1800 caractères)**

Les plantes interagissent positivement, négativement ou de manière neutre avec une grande diversité de microorganismes. Ces interactions peuvent s'opérer dans la racine des plantes, où la reconnaissance et la communication se feront en partie au niveau de la membrane plasmique des cellules. Les membranes plasmiques sont composées pour presque la moitié de leurs molécules de lipides, dont les stérols. Ces derniers sont des composés importants dans les membranes cellulaires végétales, car (i) ils sont impliqués dans de nombreux processus biologiques essentiels et (ii) ils structurent les membranes en les rendant plus rigides et compactes. Le projet de thèse vise à s'intéresser à l'effet de différentes interactions racine de tomate-champignon (symbiose mycorhizienne à arbuscule, maladie et résistance) sur les stérols végétaux. Des approches complémentaires de biochimie (fractionnement cellulaire, identification et quantification par chromatographie phase gazeuse), microscopie confocale (localisation des stérols) et biologie moléculaire (qRT PCR) permettront d'évaluer si et comment la quantité et/ou la composition en stérols sont modifiés selon les différents contextes d'interactions biotiques. Les conséquences sur les propriétés et l'organisation de la membrane plasmique de tels remaniements de son mélange de stérols seront mesurées par des approches de biophysique. Des mutants, obtenus par CRISPR Cas9, technologie validée sur la tomate et visant ici les gènes de la voie de biosynthèse des stérols, permettront d'apporter les premières briques de notre compréhension de l'implication des stérols dans les interactions plante-microorganismes.

Plants interact positively, negatively, or neutrally with a wide variety of microorganisms. These interactions can take place in the roots of plants, where recognition and communication start at the level of the plasma membrane of plant cells. Almost half of plasma membranes are lipids, including sterols. The latter are important compounds in living membranes, as (i) they are involved in many essential biological processes and (ii) they structure membranes by making them more rigid and compact. The thesis project aims to investigate the effect of different tomato root-fungus interactions (arbuscular mycorrhizal symbiosis, disease and resistance) on plant sterols. Complementary biochemistry approaches (cell fractionation, identification and quantification by gas chromatography), confocal microscopy (sterol localization) and molecular biology (qRT PCR) will assess whether and how the amount and/or composition of sterols are modified according to the different contexts of biotic

interactions. The consequences on the properties and organization of the plasma membrane of such rearrangements of its sterol mixture will be measured by biophysical approaches. Mutants, obtained by CRISPR Cas9, a technology validated on tomatoes and targeting here genes involved in the sterol biosynthesis pathway, will provide the first bricks of our understanding of the involvement of sterols in plant-microorganism interactions.

**Préciser le domaine de compétence dans la liste ci-dessous (2 choix possibles maximum – ne pas modifier les intitulés : ils sont imposés par certains sites web) :**

✓ Biologie

**Mots clés :** Interactions Tomate-Champignons, stérols, membrane plasmique, état d'ordre et propriétés biophysiques, réponse adaptative.