

Etude de l'impact de la formation d'arabidopsides sur les chloroplastes d'*Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh., en condition de stress

Auteur : De Zutter, Thomas

Promoteur(s) : Fauconnier, Marie-Laure

Faculté : Gembloux Agro-Bio Tech (GxABT)

Diplôme : Master en bioingénieur : chimie et bioindustries, à finalité spécialisée

Année académique : 2020-2021

URI/URL : <http://hdl.handle.net/2268.2/13185>

Avertissement à l'attention des usagers :

Tous les documents placés en accès ouvert sur le site le site MatheO sont protégés par le droit d'auteur. Conformément aux principes énoncés par la "Budapest Open Access Initiative"(BOAI, 2002), l'utilisateur du site peut lire, télécharger, copier, transmettre, imprimer, chercher ou faire un lien vers le texte intégral de ces documents, les disséquer pour les indexer, s'en servir de données pour un logiciel, ou s'en servir à toute autre fin légale (ou prévue par la réglementation relative au droit d'auteur). Toute utilisation du document à des fins commerciales est strictement interdite.

Par ailleurs, l'utilisateur s'engage à respecter les droits moraux de l'auteur, principalement le droit à l'intégrité de l'oeuvre et le droit de paternité et ce dans toute utilisation que l'utilisateur entreprend. Ainsi, à titre d'exemple, lorsqu'il reproduira un document par extrait ou dans son intégralité, l'utilisateur citera de manière complète les sources telles que mentionnées ci-dessus. Toute utilisation non explicitement autorisée ci-avant (telle que par exemple, la modification du document ou son résumé) nécessite l'autorisation préalable et expresse des auteurs ou de leurs ayants droit.

**ETUDE DE L'IMPACT DE LA FORMATION
D'ARABIDOPSIDES SUR LES
CHLOROPLASTES D'*ARABIDOPSIS
THALIANA* (L.) HEYNH., EN CONDITION DE
STRESS**

THOMAS DE ZUTTER

**TRAVAIL DE FIN D'ÉTUDES PRÉSENTÉ EN VUE DE L'OBTENTION DU DIPLÔME DE
MASTER BIOINGÉNIEUR EN CHIMIE ET BIO-INDUSTRIES**

ANNÉE ACADÉMIQUE 2020-2021

(CO)-PROMOTEUR(S): FAUCONNIER MARIE-LAURE & GENVA MANON

Copyright© Toute reproduction du présent document, par quelque procédé que ce soit, ne peut être réalisée qu'avec l'autorisation de l'auteur et de l'autorité académique de Gembloux Agro-Bio Tech.

Le présent document n'engage que son auteur.

**ETUDE DE L'IMPACT DE LA FORMATION
D'ARABIDOPSIDES SUR LES
CHLOROPLASTES D'*ARABIDOPSIS
THALIANA* (L.) HEYNH., EN CONDITION DE
STRESS**

THOMAS DE ZUTTER

**TRAVAIL DE FIN D'ÉTUDES PRÉSENTÉ EN VUE DE L'OBTENTION DU DIPLÔME DE
MASTER BIOINGÉNIEUR EN CHIMIE ET BIO-INDUSTRIES**

ANNÉE ACADÉMIQUE 2020-2021

(CO)-PROMOTEUR(S): FAUCONNIER MARIE-LAURE & GENVA MANON

Institution d'accueil

Ce travail de fin d'études a été réalisé au sein du Laboratoire de Chimie des Molécules Naturelles (LCMN) de Gembloux Agro-Bio Tech (Université de Liège).

Remerciements

Merci à mes promotrices, Marie-Laure Fauconnier et Manon Genva, pour leur énergie rayonnante, leurs conseils pertinents et leur sens critique.

Merci au LCMN (CGO), au CBI et au LBMI, pour avoir pu utiliser leurs appareils mais surtout pour l'aide et la bonne humeur des belles personnes avec qui j'ai pu y travailler : de façon non-exhaustive, Danny, Thomas, Manon, Laura, Brieuc et Aurélien.

Merci à mes camarades, à Hélène, à ma maman, à mon papa ainsi qu'à mon frangin Benjamin sans qui je ne serais pas qui je suis aujourd'hui.

Merci au Grand Chercheur Souli'. Nio far.

Résumé

Les oxylipines sont une famille de lipides oxydés aux rôles multiples dans le développement et dans les réponses de défense des plantes. Parmi ces molécules, les arabidopsides sont une classe de galactolipides oxydés qui sont formés en grandes quantités chez diverses espèces végétales dans les membranes des chloroplastes suite à un stress (a)biotique. Le premier objectif de ce travail était d'étudier l'impact de la formation d'arabidopsides, suite à la reconnaissance de la protéine d'avirulence de *Pseudomonas syringae* AvrRpm1, sur les chloroplastes d'*Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. Le deuxième objectif de ce travail était de déterminer la localisation sub-cellulaire de ces arabidopsides au sein des chloroplastes. Pour atteindre ces objectifs, un protocole d'isolation et de fractionnement des chloroplastes a été mis au point. Des chloroplastes ayant accumulé ou non des arabidopsides ont été extraits à partir de plants d'*A. thaliana* stressés ou non, respectivement. Les résultats ont montré que la reconnaissance de l'AvrRpm1 ne modifiait significativement ni la taille, ni la morphologie, ni l'intensité de fluorescence des chlorophylles, ni le potentiel zêta des chloroplastes stressés en comparaison avec les témoins négatifs. Ce potentiel zêta a aussi été mesuré sur les thylakoïdes, sans différence significative suite au stress. Cependant, la fluidité des membranes des thylakoïdes a augmenté de façon significative suite à ce dernier. En ce qui concerne la localisation sub-cellulaire des arabidopsides, de grandes quantités d'arabidopsides A, B, D, E et G ont été détectées dans les thylakoïdes. De plus, les arabidopsides B et D ont été détectés dans le stroma des chloroplastes. Aucun arabidopside n'a été détecté dans l'enveloppe externe des chloroplastes ni dans les plastoglobules.

Mots-clés : AvrRpm1, effecteur, HPLC-MS, localisation sub-cellulaire, oxylipine, stress biotique, thylakoïde.

Abstract

Oxylipins are a family of oxidized lipids with multiple roles in plant developmental and defense responses. Among these molecules, arabidopsides are a class of oxidized galactolipids that are formed in large quantities in various plant species in chloroplast membranes upon (a)biotic stresses. The first objective of this work was to study the impact of arabidopside formation, following recognition of the *Pseudomonas syringae* avirulence protein AvrRpm1, on *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh chloroplasts. The second objective of this work was to determine the subcellular localization of these arabidopsides within chloroplasts. To achieve these objectives, a chloroplast isolation and fractionation protocol was developed. Chloroplasts with and without arabidopside accumulation were extracted from stressed and unstressed *A. thaliana* plants, respectively. The results showed that AvrRpm1 recognition did not significantly alter the size, morphology, chlorophyll fluorescence intensity, or zeta potential of stressed chloroplasts compared with negative controls. This zeta potential was also measured on thylakoids, without significant difference following stress. However, the fluidity of thylakoid membranes increased significantly following stress. Regarding the subcellular localization of arabidopsides, large amounts of arabidopsides A, B, D, E and G were detected in thylakoids. In addition, arabidopsides B and D were detected in the stroma of chloroplasts. No arabidopsides were detected in the outer envelope of chloroplasts nor in the plastoglobules.

Key-words: AvrRpm1, effector, HPLC-MS, sub-cellular localization, oxylipin, biotic stress, thylakoid.

Table des matières

| | |
|--|-----|
| Institution d'accueil | I |
| Remerciements | I |
| Résumé | III |
| Abstract | III |
| Table des matières | V |
| Liste des figures..... | IX |
| Liste des tableaux | XI |
| Liste des abréviations | XI |
| Contexte de l'étude..... | 1 |
| Etude bibliographique | 1 |
| I. L'Immunité innée des plantes à l'encontre des pathogènes | 1 |
| 1. Défenses constitutives | 1 |
| 2. Défenses induites..... | 1 |
| a) Pattern-Triggered Immunity | 1 |
| b) Effector-Triggered Immunity | 3 |
| c) Modèle zig-zag | 3 |
| 3. Résistance induite..... | 4 |
| a) Résistance systémique acquise | 4 |
| b) Résistance systémique induite..... | 5 |
| II. Cross-talk de la voie des jasmonates | 5 |
| III. Les oxylipines..... | 7 |
| 1. Diversité des oxylipines | 7 |
| 2. Biosynthèse des oxylipines..... | 8 |
| a) Biosynthèse des jasmonates | 9 |
| b) Biosynthèse des arabidopsides | 10 |
| 3. Fonctions des oxylipines | 10 |
| a) L'acide jasmonique | 10 |
| b) L'acide 12- <i>oxo</i> -phytyldiénoïque..... | 11 |
| c) Fonctions des arabidopsides | 11 |
| IV. Chloroplaste..... | 11 |
| 1. Fonctions | 11 |
| 2. Ultrastructure..... | 12 |
| 3. Composition lipidique des membranes chloroplastiques | 13 |
| 4. Rôles des chloroplastes dans les réponses aux stress | 15 |
| Objectifs | 16 |
| Matériel et méthodes | 17 |

| | | |
|------|---|----|
| I. | Production de plants d' <i>Arabidopsis thaliana</i> L..... | 17 |
| II. | Induction, extraction et analyse des arabidopsides..... | 17 |
| 1. | Induction du stress..... | 17 |
| 2. | Extraction des lipides et séparation des arabidopsides sur colonne SPE..... | 18 |
| a) | Sur feuilles d' <i>A. thaliana</i> | 18 |
| b) | Sur chloroplastes isolés et sous-fractions de chloroplastes : | 19 |
| 3. | Détection et dosage des arabidopsides par HPLC-IT-MS | 19 |
| III. | Isolation des chloroplastes et des thylakoïdes | 20 |
| 1. | Isolation des chloroplastes..... | 20 |
| 2. | Détermination de la concentration en chlorophylle totale des chloroplastes isolés | 21 |
| 3. | Isolation des thylakoïdes | 21 |
| IV. | Localisation sub-cellulaire des arabidopsides | 21 |
| 1. | Schéma général du fractionnement..... | 22 |
| 2. | Solutions à préparer..... | 22 |
| 3. | Isolation des chloroplastes et purification sur gradients de Percoll®..... | 23 |
| 4. | Fractionnement des chloroplastes et purification des sous-compartiments sur gradient de saccharose..... | 23 |
| 5. | Lavage et concentration de l'enveloppe et des membranes thylakoïdales | 23 |
| 6. | Séparation des plastoglobules associés aux membranes thylakoïdales | 23 |
| V. | Analyses sur les chloroplastes et des thylakoïdes isolés | 24 |
| 1. | Microscopie..... | 24 |
| 2. | Cytométrie en flux..... | 24 |
| 3. | Potentiel zêta | 25 |
| 4. | Fluidité membranaire | 25 |
| VI. | Statistiques..... | 27 |
| | Résultats et discussion..... | 28 |
| I. | Induction de la formation d'arabidopsides à la dexaméthasone..... | 28 |
| 1. | Détermination du temps optimal suite à l'induction | 28 |
| 2. | Quantification des arabidopsides contenus dans les feuilles d' <i>A. thaliana</i> | 29 |
| II. | Optimisation des protocoles d'isolation et de fractionnement des chloroplastes et thylakoïdes..... | 30 |
| III. | Analyses sur les chloroplastes | 32 |
| 1. | Cytométrie en flux..... | 32 |
| a) | Taille et morphologie des chloroplastes | 33 |
| b) | Activité photosynthétique..... | 33 |
| c) | Discussion générale sur la CF | 33 |
| 2. | Fluidité membranaire | 34 |
| 3. | Potentiel zêta | 35 |
| 4. | Quantification des arabidopsides contenus dans les chloroplastes..... | 38 |

| | |
|---|----|
| IV. Localisation sub-cellulaire des arabidopsides | 39 |
| Conclusion et perspectives | 42 |
| Annexes..... | 49 |
| 1. Annexes liées au matériel et méthodes..... | 49 |
| 2. Droites de calibrage des arabidopsides A, B et D et courbes de calibrage des arabidopsides E et G 51 | |
| 3. Résultats bruts | 54 |

Liste des figures

| | |
|---|----|
| Figure 1. Réponses cellulaires et physiologiques de la plante suite à l'activation du PTI. Adapté depuis (Yu et al., 2017)..... | 2 |
| Figure 2. Modèle zig-zag (adapté depuis Jones et al., 2006)..... | 4 |
| Figure 3. Exemple de cross-talk entre phytohormones dans le SAR et l'ISR. Celles-ci interagissent différemment selon le type de résistance et selon l'espèce (adapté depuis Vlot et al. 2021). Comparaison entre une monocotylédone (Hordeum) et dicotylédone | 6 |
| Figure 4. Structure chimique de l'acide 12-oxo-phytodiénoïque (OPDA) (A.), de l'acide 12-dinor-oxo-phytodiénoïque (dnOPDA) (B.) et de l'acide jasmonique (C.). | 7 |
| Figure 5. Structure chimique des arabidopsides (Genva et al., 2019). | 8 |
| Figure 6. Biosynthèse de l'acide jasmonique (en noir) et des arabidopsides (en bleu) chez <i>Arabidopsis thaliana</i> . Adapté d'après (Genva et al., 2019). | 9 |
| Figure 7. Représentation 3D schématique d'un chloroplaste de plante supérieure. Adapté d'après (Taiz et al., 2014). | 12 |
| Figure 8. Représentation 3D du système de membranes thylakoïdales des plantes supérieures. Adapté d'après (Staehelin et al., 2020). | 13 |
| Figure 9. Composition lipidique des membranes des chloroplastes. Adapté d'après (Andersson et al., 2009)..... | 13 |
| Figure 10. Constituants lipidiques des membranes de chloroplastes. Adapté d'après (Andersson et al., 2009)..... | 14 |
| Figure 11. Illustration et abréviations des modalités de plants d' <i>A. thaliana</i> utilisés dans le cadre de ce travail..... | 18 |
| Figure 12. Gradient de Percoll® avec séparation des chloroplastes fragmentés (bande supérieure) et intacts (bande inférieure). | 21 |
| Figure 13. Résultats attendus dans les gradients de séparation des différentes étapes d'isolation. c) Séparation des chloroplastes fragmentés et intègres sur gradient de Percoll. d) Séparation des fractions stroma, enveloppes et thylakoïdes sans plastoglobules sur gradient de saccharose. f) Séparation des thylakoïdes et des plastoglobules sur gradient de saccharose. | 22 |
| Figure 14. Structures des chlorophylles a et b. Adapté d'après (Guidi et al., 2017). | 25 |
| Figure 15. Structures du DPH et du TMA-DPH. | 26 |
| Figure 16. Spectres d'excitation et d'émission de la DPH incorporée dans des thylakoïdes. Adapté d'après (Ford, 1983) | 26 |
| Figure 17. Dosage par HPLC-MS des arabidopsides A, B, D, E et G formés au cours du temps, suite à l'induction avec une solution de dexaméthasone (2 mM) des plantes <i>A. thaliana</i> RPM1. | 28 |
| Figure 18. Dosage par HPLC-MS des arabidopsides A, B et G formés au cours du temps, suite à l'induction avec une solution de dexaméthasone (2 mM) des plantes <i>A. thaliana</i> RPM1. | 29 |
| Figure 19. Teneurs en arabidopsides A, D, E et G des feuilles d' <i>A. thaliana</i> des 4 modalités. | 30 |
| Figure 20. Tests préliminaires d'isolation des chloroplastes sur du cresson des fontaines (<i>Nasturtium officinale</i>). | 30 |
| Figure 21. Gradient de Percoll obtenu avec le protocole d'isolation des chloroplastes optimisé. b) Visualisation des chloroplastes intègres d' <i>A. thaliana</i> au microscope (100x). c) Thylakoïdes isolés à partir des chloroplastes d' <i>A. thaliana</i> d) Comparaison des chloroplastes isolés avec ceux de (Bhattacharya et al., 2020). | 31 |
| Figure 22. Moyennes et écart-types des mesures réalisées par cytométrie en flux sur les chloroplastes isolés à partir des 4 modalités..... | 32 |
| Figure 23. Résultats obtenus en CF. a) Exemple représentatif d'un graphique de densité b) Histogrammes obtenus à partir du graphique de densité. c) Superposition des histogrammes pour chaque modalité et pour chaque répétition. | 34 |

| | |
|--|----|
| Figure 24. Comparaison du degré de polarisation de fluorescence de sondes (DPH et TMA-DPH) insérées dans les membranes thylakoïdales des témoins négatifs (en vert) et de la plante stressée (en rouge). | 35 |
| Figure 25. Exemple de graphique obtenu pour la mesure du potentiel zêta (n=4) des chloroplastes de RPM1. | 36 |
| Figure 26. Exemple de graphique obtenu pour la mesure du potentiel zêta (n=4) des thylakoïdes de RPM1 – Dex 2h..... | 36 |
| Figure 27. Comparaison du potentiel zêta des chloroplastes et des thylakoïdes des témoins négatifs (en vert) et de la plante stressée (en rouge). | 37 |
| Figure 29. Teneurs en arabidopsides A, B et D des chloroplastes, isolés et analysés, pour les 4 modalités. | 39 |

Liste des tableaux

| | |
|--|----|
| Tableau 1. Composition lipidique des membranes thylakoïdales. Adapté d'après (Staehelin et al., 1996). | 14 |
| Tableau 2. Gradient de solvants pour l'analyse HPLC-MS des arabidopsides..... | 19 |
| Tableau 3. Quantification des arabidopsides A, B, C, D et E. Adapté d'après (Genva et al., 2020)..... | 20 |
| Tableau 4. Paramètres du cytomètre en flux BD Accuri™ C6 | 24 |
| Tableau 5. Localisation et quantification par HPLC-MS des arabidopsides A, B, D, E et G.. | 40 |

Liste des abréviations

(dn)OPDA : dnOPDA et OPDA

AOC : Allene oxide cyclase

AOS : Allene oxide synthase

A. Thaliana : *Arabidopsis thaliana* (L.) HEYNH.

Avr : Avirulence

Col0 : Type sauvage *Columbia-0* d'*A. thaliana*

CF : Cytométrie en flux

DAMP : (host-derived) Damage-associated molecular pattern

Dex : Dexaméthasone

DGDG : Digalactosyldiacylglycérol

dnOPDA : Acide 12-dinor-*oxo*-phytodiénoïque

ET : Ethylène

ETI : Effector-triggered immunity

ETS : Effector-triggered susceptibility

HPLC : High-Performance Liquid Chromatography

ISR : Résistance systémique induite

JA-Ile : (+)-7-*iso*-jasmonoyl-L-isoleucine

LOX : Lipoxigénase

MAMP : Microbial-associated molecular pattern

MeJA : Jasmonate de méthyle

MeSA : Salicylate de méthyle

MGDG : Monogalactosyldiacylglycérol

MS : Spectrométrie de masse

OPDA : Acide *cis*-(+)-12-*oxo*-phytodiénoïque

Oxylipine : Phyto-oxylipine

PAMP : Pathogen-associated molecular pattern

PGPR : Plant growth-promoting rhizobacteria

PRR : Pattern recognition receptor

P. syringae : *Pseudomonas syringae*

PTI : Pattern-triggered immunity

ROS : Espèces réactives de l'oxygène

RPM1: Mutant *avrRpm1/Col-0* d'*A. thaliana*

RPM13: Mutant *avrRpm1/rpm1.3* d'*A. thaliana*

SA : Acide salicylique

SA/JA : acide salicylique et jasmonates

SAR : Résistance systémique acquise

Contexte de l'étude

Les plantes font face à de nombreux stress, abiotiques (e.g. froid/gel, sécheresse, excès de lumière, salinité, chaleur) et biotiques (e.g. micro-organismes pathogènes, insectes ravageurs). Ces stress se traduisent, pour l'homme, en des pertes de qualité et de rendement des cultures.

Dans un contexte de changement climatique et de croissance démographique, sur une planète aux surfaces arables et aux ressources finies, il est impératif de mieux comprendre l'incroyable complexité du fonctionnement des plantes et de leur compromis croissance-immunité. Ceci afin de, premièrement, augmenter le rendement des cultures et, deuxièmement, afin de trouver des alternatives à l'application des produits phytosanitaires conventionnels aux conséquences néfastes sur l'environnement et sur la santé de l'homme.

Pour ce faire, ce travail de fin d'études s'est intéressé à l'impact d'un stress biotique sur la plante *Arabidopsis thaliana*. Celle-ci fait partie des Brassicaceae, une famille botanique à l'importance agronomique et économique non négligeable. C'est dans cette petite plante annuelle que, assez récemment et grâce à l'amélioration des techniques analytiques, ont été découverts les arabidopsides, une classe de lipides oxydés accumulés en grandes quantités suite aux stress et dont les rôles précis restent encore à élucider, malgré des études de plus en plus nombreuses sur leurs fonctions multiples dans le développement et dans les réponses de défense des plantes.

Etude bibliographique

I. L'Immunité innée des plantes à l'encontre des pathogènes

Les plantes possèdent de nombreuses armes et barrières pour se défendre qui peuvent être simples ou complexes, constitutives ou inductibles, spécifiques ou non, locales ou systémiques et qui mettent en jeu des mécanismes structuraux et des réponses biochimiques diverses, modulées en fonction de l'agresseur.

1. Défenses constitutives

Les défenses constitutives sont présentes indépendamment de la présence du prédateur. A l'encontre des microorganismes pathogènes en particulier, on distingue d'une part les défenses mécaniques dont le but est d'empêcher la pénétration de ceux-ci dans l'organisme (e.g. cuticule cireuse des surfaces foliaires, paroi cellulaire, écorce) et d'autre part les défenses chimiques nommées **phytoanticipines** qui sont des métabolites secondaires (e.g. glucosinolates chez certaines Brassicaceae) ayant notamment une toxicité directe envers le pathogène et/ou induisant une inhibition de sa croissance (Jones et al., 2006; Walters, 2010).

2. Défenses induites

Outre les défenses constitutives, il existe des défenses induites suite à la reconnaissance d'un pathogène. Essentiellement, celles-ci sont composées du « **Pattern-Triggered Immunity** » (PTI) et de l'« **Effector-Triggered Immunity** » (ETI) (Jones et al., 2006; Lee et al., 2017).

a) Pattern-Triggered Immunity

Chaque cellule végétale possède, dans sa membrane plasmique, des « Pattern-Recognition Receptors » (PRRs) (Lee et al., 2017), capables de reconnaître des éliciteurs tels que les « Pathogen-Associated Molecular Patterns » (PAMPs) ou « Microbial-Associated Molecular Patterns » (MAMPs) qui sont des signatures moléculaires microbiennes comme la chitine, la flagelline ou les lipopolysaccharides (Walters, 2010; Yu et al., 2017). Les PRRs sont également capables de reconnaître les « Damage-Associated Molecular Patterns » (DAMPs), des signatures moléculaires issues de la dégradation des cellules de la plante (Nürnberger et al., 2009; Yu et al., 2017).

La détection de ces éliciteurs active le PTI (*Figures 1 et 2.*). En bref, la formation du complexe PRR-éliciteur entraîne la production rapide et transitoire d'**espèces réactives de l'oxygène (ROS)** (i.e. **burst oxydatif**) et l'apparition rapide d'un influx de Ca^{2+} à travers la membrane plasmique entraînant des cascades de phosphorylation menant à l'expression de gènes de défense ainsi qu'aux réponses cellulaires et physiologiques de défense (Walters, 2010; Vidhyasekaran, 2014; Lee et al., 2017; Yu et al., 2017; Li, Lu, et al., 2020; Nishad et al., 2020) (*Figure 1.*). L'activation de ces gènes de défense a comme conséquences notamment un dépôt de **callose** renforçant les parois cellulaires ainsi que la production d'enzymes hydrolytiques et de métabolites secondaires tels que les phytoalexines. Les **phytoalexines** sont produits *de novo* suite à une infection (Ahuja et al., 2012) et possèdent, au même titre que les phytoanticipines, une toxicité directe envers le pathogène et/ou un effet inhibiteur sur sa croissance.

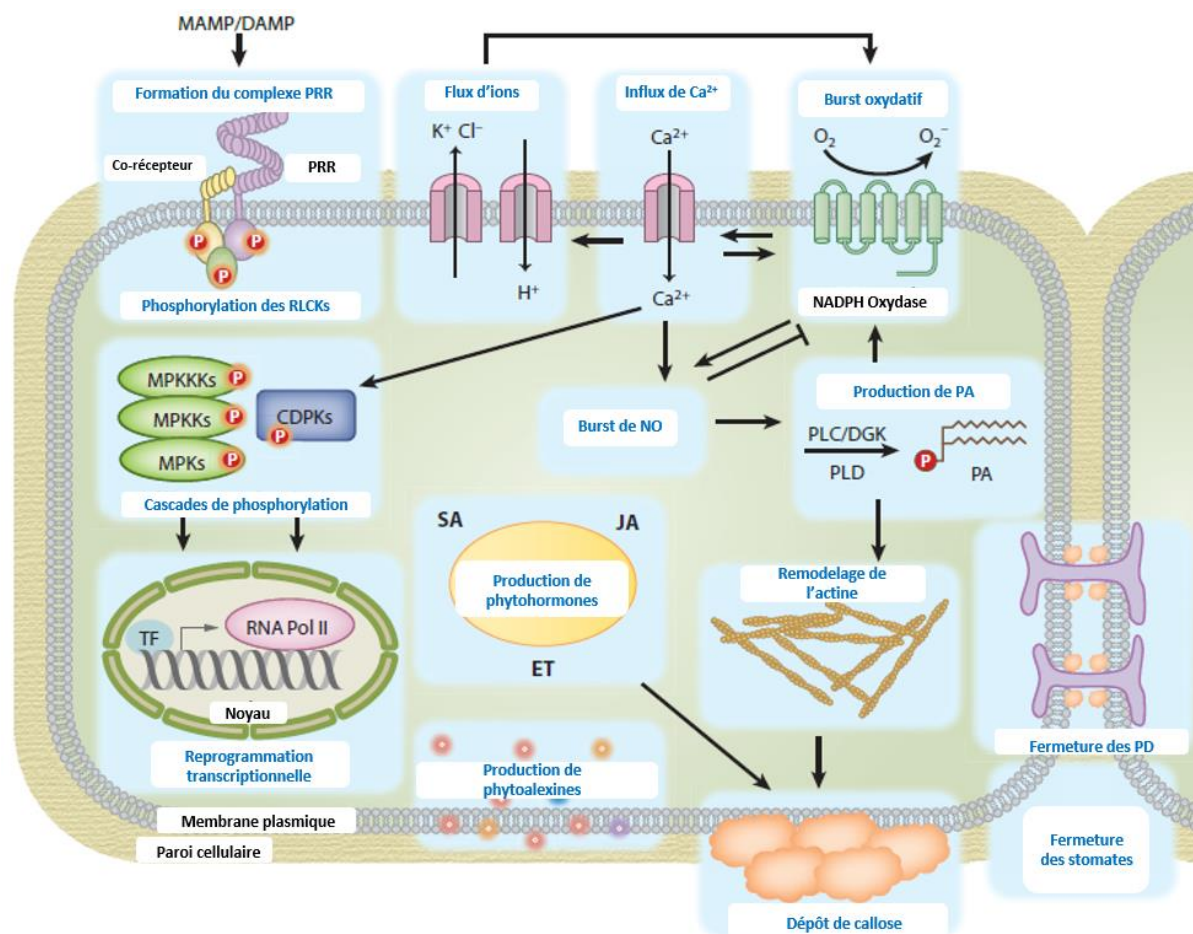


Figure 1. Réponses cellulaires et physiologiques de la plante suite à l'activation du PTI. Adapté depuis (Yu et al., 2017). Les PRRs reconnaissent des signaux moléculaires (MAMP/DAMP) et recrutent des co-récepteurs, ce qui entraîne une série de réponses cellulaires et physiologiques. La formation du complexe PRR entraîne des cascades de phosphorylation, qui régulent la reprogrammation transcriptionnelle des gènes et d'autres réponses cellulaires. Les lignes fléchées et en forme de T représentent des régulations positives et négatives, respectivement. Légende : CDPKs, calcium-dependent protein kinases ; DGK, diacylglycérol kinase ; ET, éthylène ; JA, acide jasmonique ; MPKs, mitogen-activated protein kinases ; PD : plasmodesmes ; PLC, phospholipase C ; PLD, phospholipase D ; RLCKs, receptor-like protein kinases ; RNA Pol II, arn polymérase II ; SA, acide salicylique ; TF, facteur de transcription.

Les ROS telles que le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2), l'anion superoxyde (O_2^-), le singulet d'oxygène ($^1\text{O}_2$) et le radical hydroxyle (OH^\bullet) sont produits notamment lors de la photosynthèse et jouent un rôle central dans les réponses de défense (Waszczak et al., 2018; Farooq et al., 2019). En effet, elles sont impliquées dans les influx de Ca^{2+} , dans les phosphorylations, dans l'expression de facteurs de transcription et dans plusieurs voies de signalisation telles que celles de l'acide salicylique, de l'éthylène, des jasmonates et de la signalisation rétrograde issue du chloroplaste (c.fr IV. Chloroplaste) (Vidhyasekaran, 2014; Waszczak et al., 2018). Le **monoxyde d'azote (NO)** est un messager secondaire

et radical libre gazeux diffusable, étroitement lié aux ROS dans l'induction de réponses de défense variées (Vidhyasekaran, 2014; Hasanuzzaman et al., 2019).

Les fluctuations des teneurs cytosoliques de Ca^{2+} sont possibles grâce à un ensemble de canaux perméables, de transporteurs et de pompes (Yuan et al., 2017). Selon le stimulus ou le stress, les signaux Ca^{2+} diffèrent notamment en durée, en fréquence et en amplitude (Yu et al., 2017). Ceci représente alors un ensemble d'informations spécifiques ou « signature », qui induira une réponse (Vidhyasekaran, 2014; Yuan et al., 2017) différente selon le type de signature, et donc selon le type de stimuli.

Le PTI permet donc à la plante de se défendre contre des pathogènes non-adaptés (Yu et al., 2017). Cependant, certaines bactéries pathogènes sont capables d'interférer avec le PTI en sécrétant des **effecteurs** (ou **facteurs de virulence**) (Glazebrook, 2005) dans le cytoplasme et qui vont soit permettre d'empêcher leur reconnaissance par la plante hôte soit supprimer la transduction du signal en aval (Nürnberger et al., 2009). Ces effecteurs sont codés par des **gènes d'avirulence** ou **gènes avr** (Mackey et al., 2002a). On parle alors « d'Effector-Triggered Susceptibility » (**ETS**) (Jones et al., 2006; Reimer-Michalski et al., 2016) (*Figure 2.*).

b) Effector-Triggered Immunity

En réponse à cette stratégie microbienne de suppression de l'immunité, les plantes produisent des protéines de résistance, les **protéines R**, capables de reconnaître spécifiquement ces effecteurs (ou l'effet de ces effecteurs sur d'autres molécules) à l'intérieur de la cellule. Ces protéines R sont codées par les gènes de résistance, les **gènes R**. Si la plante et le pathogène expriment des gènes R et avr correspondants, cela enclenche « l'Effector-Triggered Immunity » (ETI) (Lee et al., 2017; Han, 2019). Par exemple, le gène *rpm1* d'*Arabidopsis* lui confère une résistance à l'encontre des bactéries *Pseudomonas syringae* exprimant le gène d'avirulence *avrRpm1* (Mackey et al., 2002a; Métraux et al., 2009).

La reconnaissance d'effecteurs microbiens engendre, comme pour le PTI, un influx rapide de Ca^{2+} , un « burst oxydatif » et des cascades de phosphorylation de protéines kinases et de facteurs de transcription qui mènent à l'activation de gènes de défense (Reimer-Michalski et al., 2016; Li, Lu, et al., 2020; Nishad et al., 2020). L'ETI engendre lui aussi, entre autres, la biosynthèse et l'accumulation des jasmonates et de l'acide salicylique dans la plante (Reimer-Michalski et al., 2016; Yu et al., 2017; Gupta et al., 2020; Nishad et al., 2020).

L'ETI est une réponse plus puissante et plus durable dans le temps que le PTI. En effet, l'ETI est souvent accompagné de la réponse hypersensible (**HR**), définie généralement comme étant « un phénomène de mort cellulaire programmée spécialisée qui a lieu rapidement dans et autour de la zone d'infection afin de limiter l'avancée du pathogène dans l'organisme » (Backer et al., 2019; Balint-Kurti, 2019; Hasanuzzaman et al., 2019).

c) Modèle zig-zag

La sélection naturelle pousse les microorganismes pathogènes à développer des effecteurs capables d'éviter ou d'inhiber l'activation de l'ETI (Jones et al., 2006). Dès lors, c'est une course à l'armement (i.e. coévolution) qui oppose le microorganisme tentant de produire de nouveaux effecteurs à la plante qui tente de détecter ces effecteurs. On parle de modèle zig-zag (*Figure 2.*).

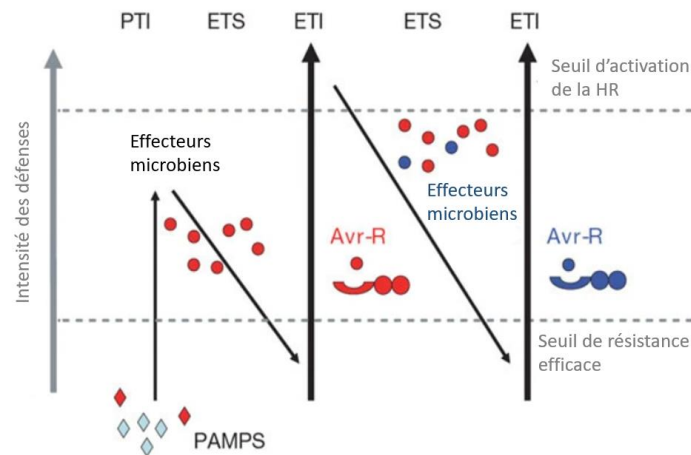


Figure 2. Modèle zig-zag (adapté depuis Jones et al., 2006). Légende : Avr-R, protéines Avr et R correspondantes; ETI, Effector-triggered immunity ; ETS, effector-triggered susceptibility ; HR, réponse hypersensible ; PAMPS, pathogen-associated molecular patterns.

Cependant, les progrès récents dans la compréhension du fonctionnement des PRRs et de leur transduction du signal en aval suggèrent que les frontières entre PTI et ETI ou MAMP/DAMP et effecteurs sont encore floues (Yu et al., 2017; Schellenberger et al., 2019). Cela indique que ce modèle est probablement incomplet, de nombreuses recherches doivent donc encore être réalisées dans ce domaine.

3. Résistance induite

Les réponses locales aux pathogènes (i.e. PTI et ETI) induisent l'activation de réponses systémiques, c'est-à-dire dans des zones distales de plantes, et ceci sans même qu'elles aient été en contact avec le pathogène (Yu et al., 2017; Li, Lu, et al., 2020; Nishad et al., 2020). En outre, les plantes infectées dans le passé montrent une résistance accrue lors d'une nouvelle infection. C'est ce que l'on appelle le « **priming** ».

Il existe deux grands types de résistances induites, la résistance systémique acquise (**SAR**), induite suite à une infection des feuilles, et la résistance systémique induite (**ISR**), induite suite à l'interaction de microorganismes bénéfiques avec les racines (Vlot et al., 2021). Ces deux types de résistance induite comportent quelques différences et permettent de lutter contre un large spectre de pathogènes (Vallad et al., 2004; Corina Vlot et al., 2009). Ces deux mécanismes confèrent une résistance à la plante pouvant durer de quelques jours à plusieurs mois après l'infection (Reimer-Michalski et al., 2016).

a) Résistance systémique acquise

L'activation de la résistance systémique acquise (SAR) est majoritairement dépendante de l'acide salicylique qui s'accumule sur le site de l'infection et dans les régions distales non-infectées (Corina Vlot et al., 2009; Jin et al., 2017). Cette phytohormone phénolique synthétisée dans les chloroplastes joue un rôle dans de nombreux processus physiologiques ainsi que dans la régulation des réponses des plantes aux stress biotiques et abiotiques (Corina Vlot et al., 2009; Jin et al., 2017). En effet, l'acide salicylique est impliqué dans l'expression systémique de gènes codants pour les « protéines liées à la pathogenèse » (**protéines PR**) (Hammerschmidt, 2009; Vidhyasekaran, 2015; Reimer-Michalski et al., 2016; Nishad et al., 2020; Vlot et al., 2021) qui confèrent la résistance aux maladies par leur activité antimicrobienne (Backer et al., 2019; Han, 2019).

On sait aussi que l'acide salicylique n'est pas mobile et que l'activation du SAR nécessite d'autres composés (Reimer-Michalski et al., 2016; Jin et al., 2017; Vlot et al., 2021). Le salicylate de méthyle (**MeSA**) est une forme inactive de l'acide salicylique qui sert de signal longue distance dans le phloème

afin de promouvoir l'accumulation d'acide salicylique et d'établir le SAR dans les tissus systémiques (Corina Vlot et al., 2009; Jin et al., 2017).

La SAR peut être transmis épigénétiquement (Vidhyasekaran, 2015; Reimer-Michalski et al., 2016) et permet aussi la transmission de résistance d'une plante à une autre suite à l'émission de composés organiques volatiles (Walters, 2010; Vlot et al., 2021).

b) Résistance systémique induite

Certaines bactéries colonisatrices de la rhizosphère, les « Plant Growth Promoting Rhizobacteria » (**PGPR**), et certains champignons impliqués dans les mycorhizes ont la capacité de promouvoir la croissance et d'induire la résistance de la plante hôte à l'encontre de pathogènes via l'activation de la résistance systémique induite (ISR) (Hammerschmidt, 2009; Walters, 2010; Reimer-Michalski et al., 2016; Nishad et al., 2020). L'ISR est également efficace contre les blessures mécaniques, les herbivores et les insectes (Zhai et al., 2017; Backer et al., 2019) et permet une résistance accrue à certains stress abiotiques (Corina Vlot et al., 2009).

Ce mécanisme de résistance induite est majoritairement dépendant de phytohormones telles que les jasmonates et l'éthylène (Vallad et al., 2004). En effet, les teneurs en acide jasmonique et en un de ses dérivés bioactifs, le (+)-7-iso-jasmonoyl-L-isoleucine (**Ja-Ile**), augmentent dans la plante suite à la détection d'un pathogène ou d'un microorganisme bénéfique tel que mentionné plus haut (Campos et al., 2014). Lorsque la teneur en JA-Ile dépasse un certain seuil, celui-ci est transporté à l'intérieur du noyau où il permet l'activation de facteurs de transcription (Campos et al., 2014; Koo, 2018; Gupta et al., 2020) et la modulation de l'expression de plusieurs centaines de gènes (Koo, 2018). L'acide jasmonique peut aussi être métabolisé en jasmonate de méthyle (**MeJA**), une molécule volatile et mobile impliquée dans la signalisation des voies de défense (Vidhyasekaran, 2015; Zhai et al., 2017). L'activation de l'ISR par les jasmonates mène à la production de métabolites secondaires ainsi qu'à des changements structuraux aux rôles directs et indirects dans la défense (Campos et al., 2014; Wasternack & Feussner, 2018).

L'**éthylène**, dont la biosynthèse est activée suite à la détection de PAMPs (Vidhyasekaran, 2015), est une autre phytohormone importante dans l'immunité des plantes (Hao et al., 2017). Le synergisme entre les voies de signalisation de l'éthylène et des jasmonates est requis pour l'activation des défenses à l'encontre des pathogènes nécrotrophes (Gupta et al., 2020). De plus, certains gènes de défense régulés par les jasmonates sont aussi régulés par l'éthylène et certains facteurs de transcription ne s'activent qu'en présence simultanée de ces phytohormones (Glazebrook, 2005).

II. Cross-talk de la voie des jasmonates

Les plantes doivent pouvoir répondre de façon propice, temporelle, spatiale et simultanée aux stress (a)biotiques tout en ajustant constamment leur physiologie et leur métabolisme afin d'optimiser leur croissance et leur reproduction (Spoel et al., 2008; Liu et al., 2021). L'intégration de toutes ces informations est possible grâce aux différentes voies de signalisation qui forment des réseaux hautement complexes, et dont la réponse résultante est ajustée grâce au « **cross-talk** » entre ces voies de signalisation. Le cross-talk fait référence au fait qu'un ou plusieurs composants d'une voie de transduction d'un signal puisse affecter une autre voie de signalisation.

Par exemple, la résistance contre les nécrotrophes (i.e. voie des jasmonates) est souvent corrélée avec une susceptibilité aux (hémi)biotrophes (i.e. voie de l'acide salicylique), et *vice versa*. En effet, de nombreuses études ont mis en lumière les **effets antagonistes** du cross-talk entre ces deux voies (Spoel et al., 2007; Walters, 2010; Reimer-Michalski et al., 2016). Certaines bactéries pathogènes sont capables de tourner cet effet antagoniste à leur avantage. Par exemple, *P. syringae*, (Kraepiel et al., 2016), produit de la **coronatine**, qui ressemble structurellement au Ja-Ile et qui stimule les réponses de défenses dépendantes des jasmonates dans les plantes dans le but d'inhiber la signalisation par l'acide salicylique

et la réponse hypersensible résultante (Spoel et al., 2008; Zhai et al., 2017; Backer et al., 2019). En réalité, les relations plante-pathogène sont bien plus complexes. Par exemple, il a été démontré que les mécanismes de défense dépendants des jasmonates peuvent également être efficaces à l'encontre de pathogènes (hémi)biotrophes (Campos et al., 2014). D'autre part, l'activation simultanée de ces deux mécanismes de défense peut aussi engendrer des **effets synergiques** (Mur et al., 2006).

Comme vu précédemment, l'acide salicylique, les jasmonates et l'éthylène sont des molécules clé dans la régulation des défenses des plantes et dans l'induction de résistances. Néanmoins, d'autres phytohormones telles que l'**acide abscissique** (Figure 3.), les **auxines**, les **cytokinines**, les **gibbérellines** et les **brassinostéroïdes**, outre leurs rôles largement étudiés dans la croissance et le développement de la plante, jouent un rôle non négligeable dans l'expression de gènes de défense variés et dans la régulation positive et/ou négative de leur signalisation (Vidhyasekaran, 2015; Yang et al., 2015; Backer et al., 2019; Jang et al., 2020; Figueroa-Macías et al., 2021; Ghorbel et al., 2021; Liu et al., 2021). En outre, l'intégration et le décodage des stimuli (a)biotiques par les chloroplastes est complémentaire au cross-talk entre phytohormones et indispensable à l'ajustement de réponses de défense adéquates.

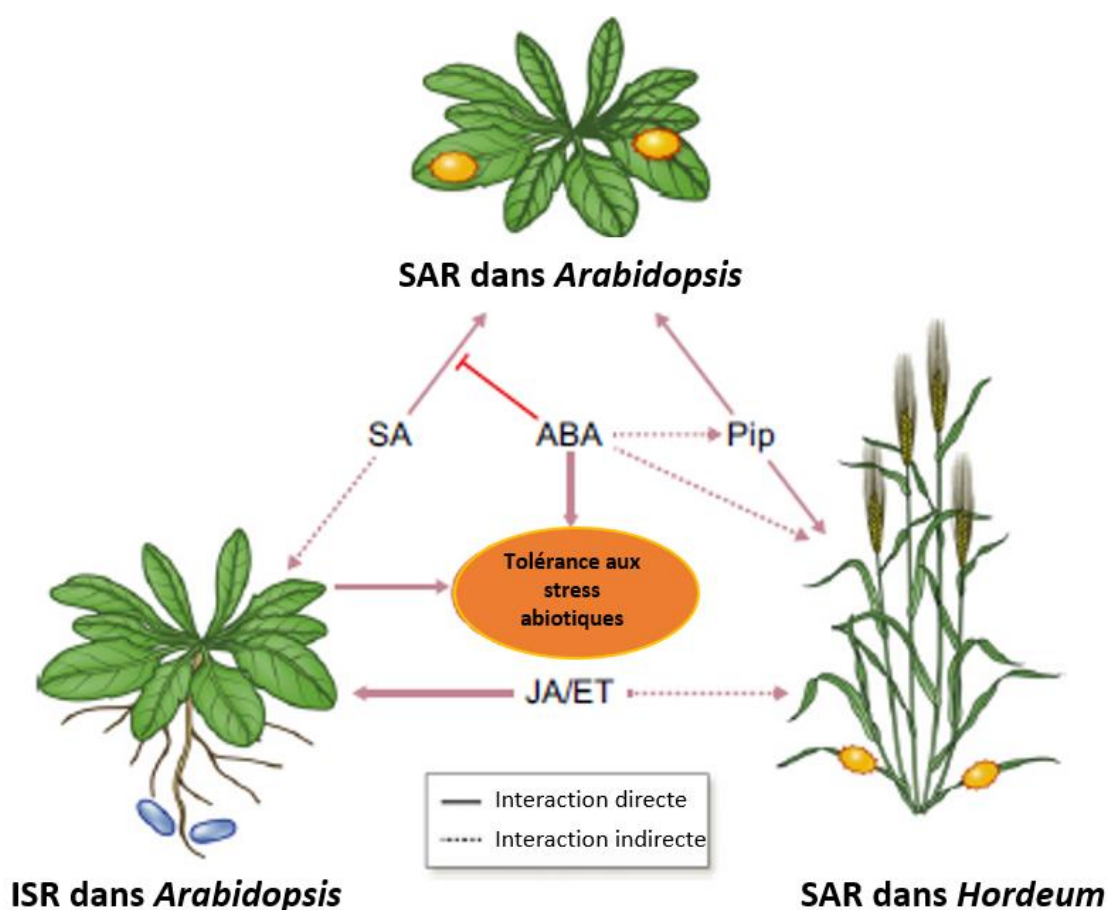


Figure 3. Exemple de cross-talk entre phytohormones dans le SAR et l'ISR. Celles-ci interagissent différemment selon le type de résistance et selon l'espèce (adapté depuis Vlot et al. 2021). Comparaison entre une monocotylédone (Hordeum) et dicotylédone

III. Les oxylipines

1. Diversité des oxylipines

L'acide jasmonique fait partie de la famille des oxylipines, qui sont une classe de molécules très diverses formées suite à l'oxydation d'acides gras insaturés, par voie enzymatique ou non (Griffiths, 2015; Wasternack & Feussner, 2018). Les oxylipines sont omniprésentes dans le règne végétal et elles peuvent soit être estérifiées, dans les membranes biologiques notamment, soit se retrouver sous forme libre.

Les oxylipines libres sont largement étudiées depuis de nombreuses années. Parmi celles-ci, les plus connues sont les **jasmonates**, une famille de molécules comprenant l'acide jasmonique (Figure 4.) et ses dérivés, qui sont retrouvées dans certains procaryotes, certaines plantes « inférieures » et dans toutes les plantes « supérieures » (Wasternack & Strnad, 2018). Certains précurseurs de l'acide jasmonique tels que l'acide 12-*oxo*-phytyldiénoïque (**OPDA**) et l'acide 12-dinor-*oxo*-phytyldiénoïque (**dnOPDA**) (Wasternack & Strnad, 2018) font également partie de la famille des jasmonates (Figure 4.).

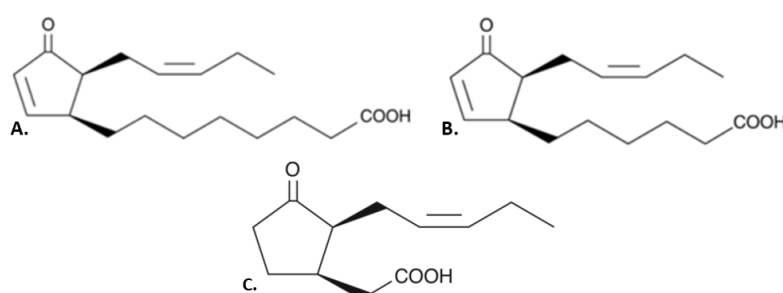


Figure 4. Structure chimique de l'acide 12-*oxo*-phytyldiénoïque (OPDA) (A.), de l'acide 12-dinor-*oxo*-phytyldiénoïque (dnOPDA) (B.) et de l'acide jasmonique (C.).

Les oxylipines peuvent également se retrouver estérifiées dans des lipides complexes comme des phospholipides et des galactolipides (Genva et al., 2019). Contrairement aux oxylipines libres, les oxylipines estérifiées ne sont étudiées que depuis récemment car, avant ces 20 dernières années, les méthodes analytiques ne permettaient pas leur caractérisation complète. Dès lors, leurs rôles biologiques *in vivo* ainsi que leur ubiquité ou non restent encore à déterminer. De plus en plus d'études s'intéressent aux oxylipines estérifiées et il en ressort une très grande diversité dans leurs structures (Göbel et al., 2009; Ibrahim, 2011; Vu et al., 2012, 2014).

Différentes familles d'oxylipines estérifiées dans des galactolipides ont été caractérisées, comme les arabidopsides et les linolipines (Genva et al., 2019). Les **arabidopsides** sont des galactolipides contenant un ou plusieurs résidus d'OPDA et/ou de dnOPDA estérifiés soit sur le groupement glycérol soit sur un groupement galactose (Wasternack & Feussner, 2018). A ce jour, sept arabidopsides différents ont été caractérisés, nommés de A à G selon leur ordre de découverte (Figure 5.). Outre leur présence chez *A. thaliana*, des arabidopsides ont été retrouvés dans différentes espèces de la famille des *Brassicaceae*, *Convolvulaceae*, *Lamiaceae* et *Asteraceae* (Genva et al., 2019).

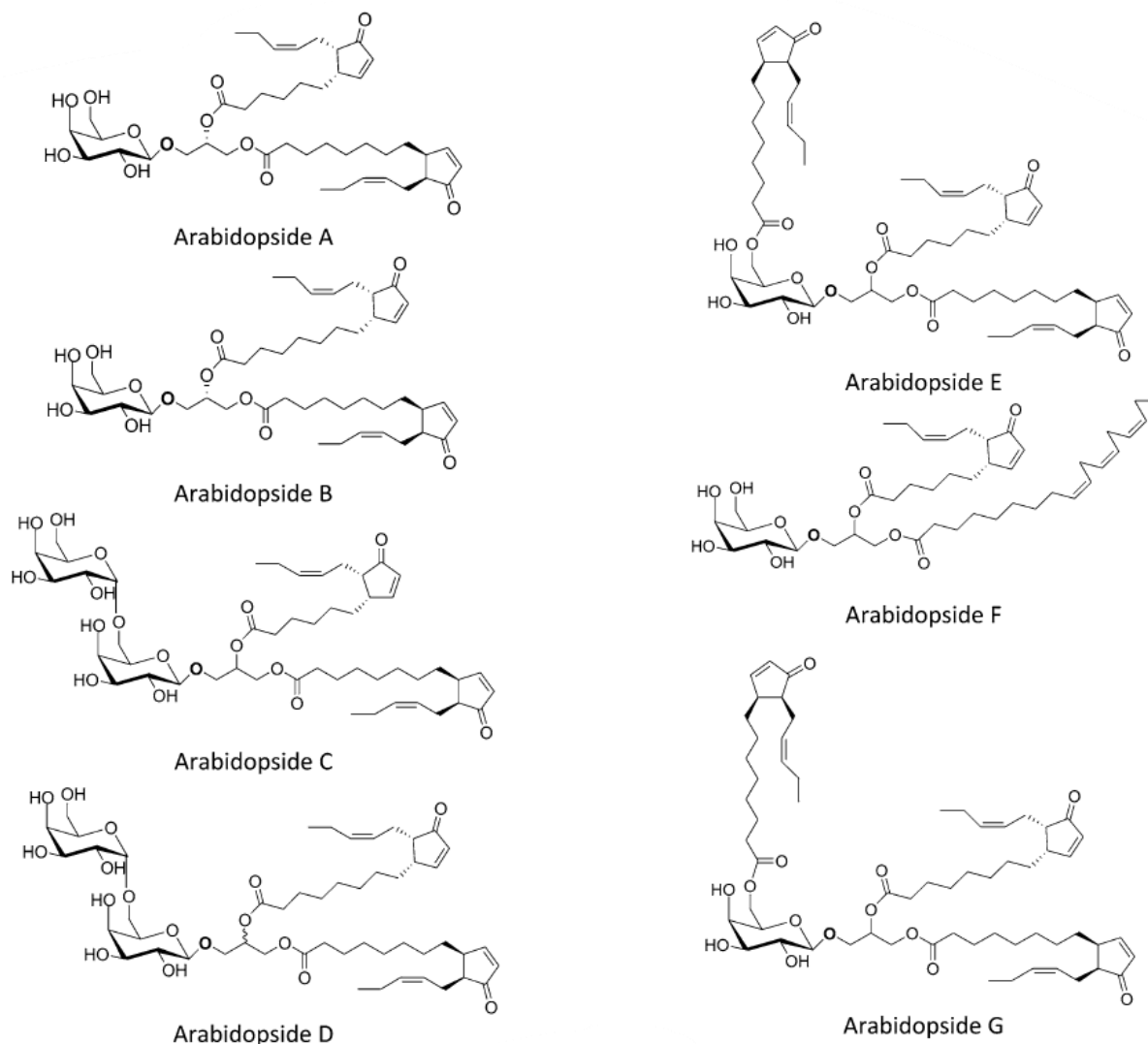


Figure 5. Structure chimique des arabidopsides (Genva et al., 2019). Les arabidopsides A, B et F sont des MGDGs oxydés. Les arabidopsides C et D sont des DGDGs oxydés. Les arabidopsides E et G sont des MGDGs oxydés et acylés.

2. Biosynthèse des oxylipines

Les oxylipines libres et estérifiées ont la même origine, à savoir des lipides complexes tels que des galactolipides et des phospholipides présents dans les membranes biologiques. Les voies de synthèse enzymatiques des oxylipines ont toutes en commun l'ajout d'oxygène dans la chaîne carbonée de l'acide gras par l'action de lipoxygénases (**LOX**) ou d' α -dioxygénases (Griffiths, 2015; Genva et al., 2019) (Figure 6.). Dans le clade des angiospermes, c'est majoritairement la voie de la LOX qui est responsable de la formation d'oxylipines (Wasternack & Feussner, 2018). Les LOX sont classées en 9- ou 13-LOX selon la position du carbone sur lequel l'oxygénation a lieu. *A. thaliana* possède quatre **13-LOX** (LOX2, LOX3, LOX4, LOX6), responsables de la formation des jasmonates (Koo, 2018; Wasternack & Feussner, 2018), et deux **9-LOX** (LOX1, LOX5) (Wasternack et al., 2013; Genva et al., 2019).

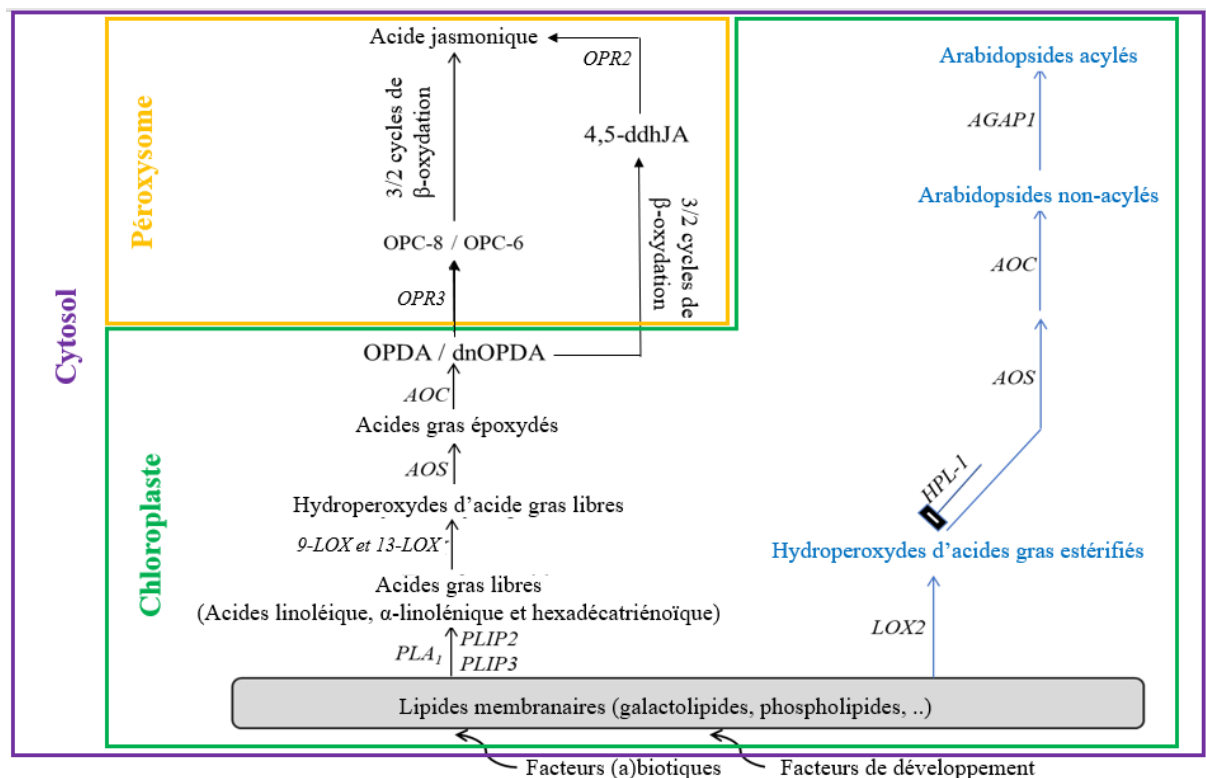


Figure 6. Biosynthèse de l'acide jasmonique (en noir) et des arabidopsides (en bleu) chez *Arabidopsis thaliana*. Adapté d'après (Genva et al., 2019). Légende : HPL-1, hydroperoxyde lyase 1 ; LOX, lipoxygénase ; OPC-6, acide 6-(3-oxo-2-(pent-2-ényl)cyclopentyl)butanoïque ; OPC-8 ; PLA₁, phospholipase A1 ; PLIP2 ou 3, Plastide lipase 2 ou 3 ; 4,5-ddhJA, acide 4,5-didéhydrojasmonique.

a) Biosynthèse des jasmonates

La plante produit de l'acide jasmonique tout au long de sa vie. Les différentes étapes et voies de cette biosynthèse sont présentées succinctement (Figures 6.).

La première étape de biosynthèse de l'acide jasmonique est l'hydrolyse, par une **phospholipase**, d'un acide α -linoléique (**α -LA**) (18:3) porté par un monogalactosyldiacylglycérol (**MGDG**), un digalactosyldiacylglycérol (**DGDG**) ou un phospholipide contenus dans la membrane des chloroplastes (Laxalt et al., 2002; Wasternack et al., 2013; Griffiths, 2015). Ensuite, une **13-LOX** insère un oxygène en position C13 du α -LA, formant ainsi de l'acide 13-hydroperoxylinoléique (**13-HPOT**). Ce dernier est transformé, par l'action successive de l'allène oxyde synthase (**AOS**) et de l'allène oxyde cyclase (**AOC**), en OPDA (Wasternack et al., 2013; Zhai et al., 2017; Genva et al., 2019). Le dnOPDA est formé grâce à l'action successive des enzymes susmentionnées, à partir d'acide hexadécatriénoïque (16:3) (Liu et al., 2021). Les OPDA et dnOPDA sont alors exportés vers le péroxysome où il sont réduits par l'OPDA réductase 3 avant de subir 3 ou 2 cycles de **β -oxydation**, respectivement (Zhai et al., 2017; Genva et al., 2019). Les OPDA et dnOPDA peuvent également subir 3 ou 2 cycles de β -oxydation, respectivement, avant d'être réduits (Chini et al., 2018; Genva et al., 2019; Liu et al., 2021). Le résultat final est la formation d'acide (+)-**7-iso-jasmonique**.

L'acide jasmonique est ensuite conjugué avec l'acide aminé isoleucine afin de former le JA-Ile, sa forme la plus active, capable de se lier au récepteur COI1 des plantes vasculaires (Wasternack & Strnad, 2018). La plante régule ses teneurs en Ja-Ile en le transformant en diverses autres formes actives, inactives ou partiellement inactives (Koo, 2018; Wasternack & Feussner, 2018; Wasternack & Strnad, 2018; Gupta et al., 2020).

b) Biosynthèse des arabidopsides

Différentes études ont montré que de grandes quantités d'arabidopsides s'accumulent chez certaines espèces végétales en conditions de stress comme lors de l'infection par un pathogène ou suite à des blessures mécaniques (Kourtchenko et al., 2007; Ibrahim, 2011; Hansen et al., 2019). Hormis la lipase, les enzymes nécessaires lors des premières étapes de la biosynthèse des arabidopsides sont identiques à celles responsables de la formation des (dn)OPDA libres (*Figure 6.*).

Les chaînes d'acides gras insaturés portées par les MGDG et DGDG peuvent ainsi être directement oxydées, par l'action de la **LOX2**, en hydroperoxydes d'acides gras. Ensuite, suite à l'action de l'AOS puis de l'AOC, ces hydroperoxydes d'acides gras estérifiés dans les membranes des chloroplastes sont transformés en (dn)OPDA, menant à la formation d'**arabidopsides non-acylés** (i.e. arabidopsides A, B, C, D et F). Enfin, l'enzyme **AGAP1** est capable de transférer un OPDA ou un dnOPDA estérifié vers le résidu galactose d'un autre arabidopside, créant ainsi les **arabidopsides acylés** (i.e. arabidopsides E et G). Ceci explique le fait que les arabidopsides non-acylés sont produits rapidement après induction du stress (Vu et al., 2014), et que leur teneur diminue ensuite en faveur d'une augmentation de celle des arabidopsides acylés (Genva et al., 2019). Par exemple, il a été montré que les arabidopsides A et B (i.e. MGDGs oxydés) s'accumulent en quantités les plus élevées 5 min après un cycle de congélation-décongélation, tandis que les teneurs en arabidopside E (i.e. MGDG oxydé acylé) sont maximales 25 min plus tard (Nilsson et al., 2012).

Concernant la localisation des arabidopsides, il a d'abord été démontré que, suite à certains stress, ces molécules s'accumulent abondamment dans les feuilles, notamment là où elles ont été blessées (Hansen et al., 2019). Comme les membranes des chloroplastes sont composées majoritairement de MGDG et DGDG, les galactolipides précurseurs des arabidopsides, et que ces organites contiennent les enzymes responsables de la formation des arabidopsides (i.e. LOX, AOS, AOC) (Wasternack & Feussner, 2018; Song et al., 2021), il a été suggéré que les arabidopsides sont localisés au sein de ces membranes. Cette hypothèse a été appuyée par deux études. D'abord, de grandes quantités de (dn)OPDA estérifiés ont été retrouvés dans les membranes thylakoïdales et seulement d'infimes quantités dans l'enveloppe des chloroplastes (Böttcher et al., 2007). De plus, une autre étude a également suggéré que l'arabidopside A était localisé dans les membranes thylakoïdales (Hansen et al., 2019). Cependant, aucune étude relative au transport des arabidopsides n'a été réalisée, que ce soit vers d'autres organites cellulaires ou vers le milieu extracellulaire.

3. Fonctions des oxylipines

Les oxylipines forment un groupe très vaste de molécules aux fonctions variées. C'est pourquoi seront exposés ici uniquement les rôles de l'acide jasmonique, de l'OPDA et des arabidopsides.

a) L'acide jasmonique

Comme vu précédemment, la forme bioactive majoritaire de l'acide jasmonique est le **Ja-Ile**, une molécule de signalisation largement impliquée dans la réponse des plantes aux stress biotiques et abiotiques ainsi que dans leur développement (Wasternack & Feussner, 2018; Nguyen et al., 2019; Ghorbel et al., 2021). De façon non-exhaustive, le Ja-Ile a un rôle dans l'induction de la tolérance à divers stress abiotiques tels que la salinité, la sécheresse, la présence de métaux lourds, la chaleur ou encore le froid. Il stimule la formation de mycorhizes, induit la production de métabolites secondaires et confère une résistance à l'encontre de pathogènes, de nématodes et d'insectes. Enfin, le Ja-Ile inhibe la formation de graines, la photosynthèse et la croissance et joue un rôle dans le développement des anthères et des organes femelles ainsi que dans la sénescence des feuilles. D'autre part, le **cis-jasmone**, obtenu après décarboxylation de l'acide jasmonique, est un composé volatil qui attire des insectes pollinisateurs (Wasternack et al., 2016) et qui a un effet répulsif envers certains insectes herbivores (Birkett et al., 2000).

b) L'acide 12-oxo-phytodiénoïque

L'**OPDA**, en plus d'être un précurseur de l'acide jasmonique, est également un composé de signalisation (Dave et al., 2012; Wasternack & Feussner, 2018). Par exemple, des études ont démontré que l'**OPDA** s'accumule suite à une blessure mécanique, contrôle la germination des graines ainsi que la croissance de l'hypocotyle, engendre la fermeture des stomates, augmente la tolérance à la sécheresse et altère les équilibres rédox ainsi que les réponses de défense de la plante (Dave et al., 2012; Wasternack et al., 2016; Wasternack & Feussner, 2018).

c) Fonctions des arabidopsides

A ce jour et malgré beaucoup d'études montrant leur accumulation suite à un stress (Dave et al., 2012; Genva et al., 2019; Song et al., 2021), notamment lors d'une blessure ou après activation de la réponse hypersensible (Andersson et al., 2006a; Kourtchenko et al., 2007; Ibrahim, 2011), les rôles précis des arabidopsides restent méconnus. Il a notamment été montré que la reconnaissance de la protéine d'avirulence de *P. syringae* AvrRpm1 par des plants d'*A. thaliana* induit l'accumulation d'oxylipines dont notamment l'arabidopside E en quantités représentant 7-8% de la teneur en lipides totaux (Andersson et al., 2006a). D'autre part, le profil en oxylipines estérifiées est dépendant de la nature du stress subi par la plante. Il est donc possible que les différentes molécules d'arabidopsides aient des rôles distincts (Andersson et al., 2006a; Vu et al., 2012; Genva et al., 2019; Song et al., 2021). Sur base de ces études, différentes hypothèses ont été émises quant aux rôles directs et indirects des arabidopsides dans la réponse des plantes aux stress et dans leur développement.

Différentes études soutiennent l'hypothèse que les arabidopsides pourraient avoir des **rôles directs** dans les mécanismes de défenses des plantes et dans les processus développementaux. En effet, il a été montré que l'arabidopside A possède un effet promoteur de la sénescence de feuilles d'avoine (Andersson et al., 2006a). De plus, certains arabidopsides inhibent la croissance racinaire du cresson. Des études *in vitro* ont aussi démontré l'effet inhibiteur des arabidopsides E et G sur la croissance de pathogènes tels que *Botrytis cinerea* et *P. syringae* (Andersson et al., 2006a; Griffiths, 2015).

D'autre part, il est possible que les arabidopsides aient des rôles indirects. En effet, les arabidopsides formés en conditions de stress pourraient servir de forme de stockage de (dn)OPDA (Kourtchenko et al., 2007; Ibrahim, 2011; Genva et al., 2019; Griffiths, 2020; Song et al., 2021) qui pourraient alors être relargués rapidement par la plante en tant que molécules de signalisation ou pour former de l'acide jasmonique lors d'un stress ultérieur (Dave et al., 2012).

IV. Chloroplaste

Le **chloroplaste** possède un rôle clé dans la synthèse de nombreuses oxylipines. Cet organelle cellulaire d'origine endosymbiotique présent chez tous les organismes photosynthétiques est dit semi-autonome car, même s'il contient son propre ADN, le noyau cellulaire en contrôle en partie la structure et les fonctions (Rascio, 2013; Lu et al., 2020).

1. Fonctions

Tout d'abord, le chloroplaste occupe une position centrale dans la **photosynthèse**. En effet, les composants principaux de la « phase claire » de la photosynthèse sont localisés dans les membranes thylakoïdales et les enzymes responsables des réactions de réduction du carbone (i.e. « phase obscure ») sont localisées dans le stroma (Taiz et al., 2014).

Les chloroplastes possèdent également un rôle majeur dans la production et/ou la modification de **nombreux métabolites primaires** (e.g. sucres, acides aminés, acides gras) **et secondaires** (e.g. alcaloïdes, pigments, vitamines, précurseurs d'hormones) (Kirchhoff, 2019). De nombreuses enzymes responsables de la synthèse d'oxylipines telles que l'acide jasmonique, l'**OPDA** et les arabidopsides

sont notamment localisées dans cet organe. Les chloroplastes sont également responsables du **stockage de glucose** sous forme d'amidon et de la **séquestration de l'azote et du soufre** (Jensen et al., 2014).

De plus, les chloroplastes peuvent moduler l'expression des gènes nucléaires, par **signalisation dite rétrograde** (Jensen et al., 2014), suite à la production de ROS, de stimuli environnementaux ou encore par l'action de pathogènes (Yang et al., 2021). C'est donc le chloroplaste qui permet, en partie, de coordonner les réponses de défense de la plante et, de ce fait, il est une des cibles clés des pathogènes (Littlejohn et al., 2020).

Enfin, de par l'allocation des ressources, la relation entre croissance et immunité est antagoniste et le chloroplaste en est le point de pivot.

2. Ultrastructure

Chez les plantes supérieures, les chloroplastes ont généralement une forme lenticulaire et leur taille varie de 5 à 10 μm (Rascio, 2013). Leur organisation est complexe (*Figures 7 et 8.*).

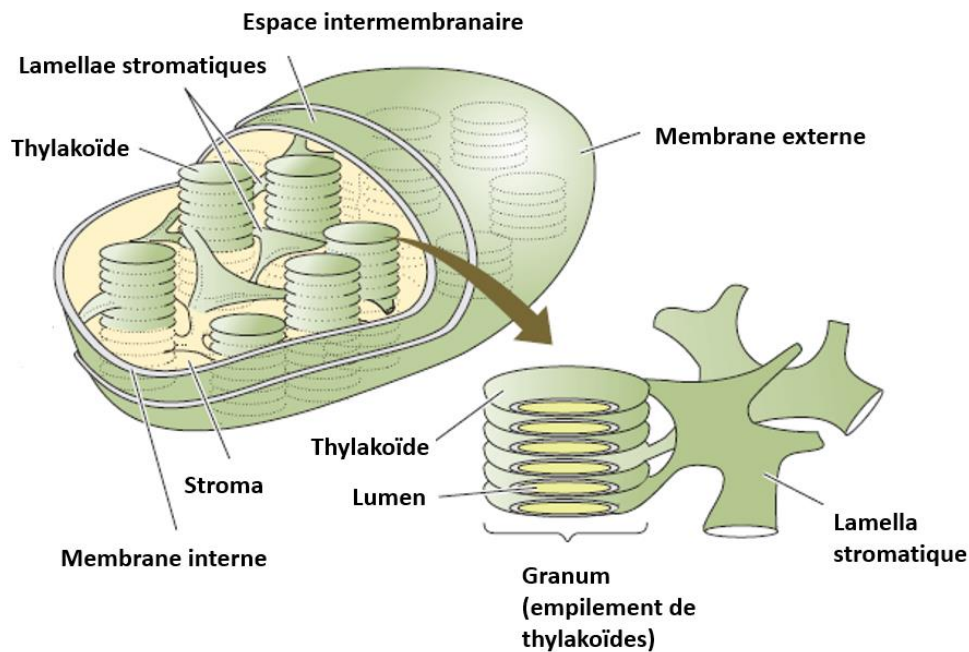


Figure 7. Représentation 3D schématisée d'un chloroplaste de plante supérieure. Adapté d'après (Taiz et al., 2014).

Les chloroplastes sont entourés d'une **enveloppe** consistant en deux membranes concentriques, les **membranes interne et externe**, séparées par l'**espace intermembranaire**. La **membrane interne** est très sélective et contient de nombreux transporteurs qui régulent les flux de métabolites et d'ions entre le chloroplaste et le cytosol ainsi que des enzymes impliquées dans les voies métaboliques des caroténoïdes et des acides gras notamment (Rascio, 2013).

Le **stroma** est le milieu interne du chloroplaste. Il contient des granules d'amidon, des ribosomes, de l'ARN et de l'ADN circulaire ainsi que des enzymes solubles engagées dans des voies métaboliques diverses (Staehelin et al., 1996; Rascio, 2013; Kirchhoff, 2019).

Au sein du stroma se trouve un système de membranes continues, les **thylakoïdes** (ou **lamellae**), délimitant un milieu aqueux, le **lumen (thylakoïdal)** (Staehelin et al., 1996). Ces thylakoïdes sont soit empilés les uns sur les autres et forment alors un **granum** (Rascio, 2013; Taiz et al., 2014) soit ils permettent la connexion entre grana. Dans ce dernier cas, on dit qu'ils sont **stromatiques**. En outre, des particules lipoprotéiques, les **plastoglobules**, peuvent s'associer au feuillet lipidique externe des membranes thylakoïdales stromatiques (*Figure 8.*) (Van Wijk et al., 2017).

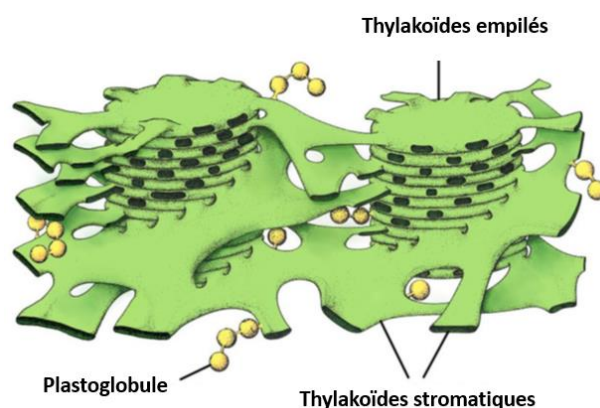


Figure 8. Représentation 3D du système de membranes thylakoïdales des plantes supérieures. Adapté d'après (Staehelin et al., 2020).

3. Composition lipidique des membranes chloroplastiques

Les membranes des chloroplastes ont une structure complexe. Elles sont organisées sous la forme de bicouches lipidiques contenant des protéines de transport notamment. Contrairement aux autres membranes végétales qui contiennent majoritairement des phospholipides, les membranes des chloroplastes sont caractérisées par de hautes teneurs en galactolipides, en particulier les **MGDG** et **DGDG** (Taiz et al., 2014). La composition lipidique de chacune de ces membranes est différente (Figure 9).

| Plant | Membrane | MGDG | DGDG | SQDG | PG | PC | PI | PE |
|-----------|----------------|-------|-------|------|------|-------|-----|----|
| Consensus | Outer envelope | 6–17 | 30 | 3–6 | 6–10 | 32–44 | 5 | 0 |
| | Inner envelope | 45–49 | 30 | 2–5 | 6–8 | 6–10 | 1–2 | 0 |
| | Thylakoid | 42–65 | 26–33 | 5–8 | 5–15 | 2–4 | 0–1 | 0 |

MGDG monogalactosyldiacylglycerol, *DGDG* digalactosyldiacylglycerol, *SQDG* sulfoquinovosyldiacylglycerol, *PG* phosphatidylglycerol, *PC* phosphatidylcholine, *PI* phosphatidylinositol, *PE* phosphatidylethanolamine

Figure 9. Composition lipidique des membranes des chloroplastes. Adapté d'après (Andersson et al., 2009). Légende : *MGDG*, monogalactosyldiacylglycérol ; *DGDG*, digalactosyldiacylglycérol ; *SQDG*, sulfoquinovosyldiacylglycérol ; *PG*, phosphatidylglycérol ; *PC*, phosphatidylcholine ; *PI*, phosphatidylinositol ; *PE*, phosphatidyléthanolamine.

Les membranes thylakoïdales, qui contiennent de nombreuses protéines et pigments (chlorophylles et caroténoïdes) (Taiz et al., 2014), sont le siège de la photosynthèse. De plus, des enzymes impliquées dans la formation des oxylipines sont associées à ces membranes. Leur ratio massique lipides acylés/protéines est d'environ 0.4 (Block et al., 1983). Outre des teneurs élevées en MGDG et DGDG, les composés lipidiques minoritaires retrouvés dans ces membranes sont deux phospholipides, la **phosphatidylcholine (PC)** et le **phosphatidylglycérol (PG)**, ainsi qu'un sulfolipide, le **sulfoquinovosyldiacylglycérol (SQDG)** (Douce et al., 1984; Andersson et al., 2009; Rascio, 2013; Taiz et al., 2014) (Figures 9 et 10). De plus, elles contiennent des quantités élevées en acides gras polyinsaturés (Staehelin et al., 1996).

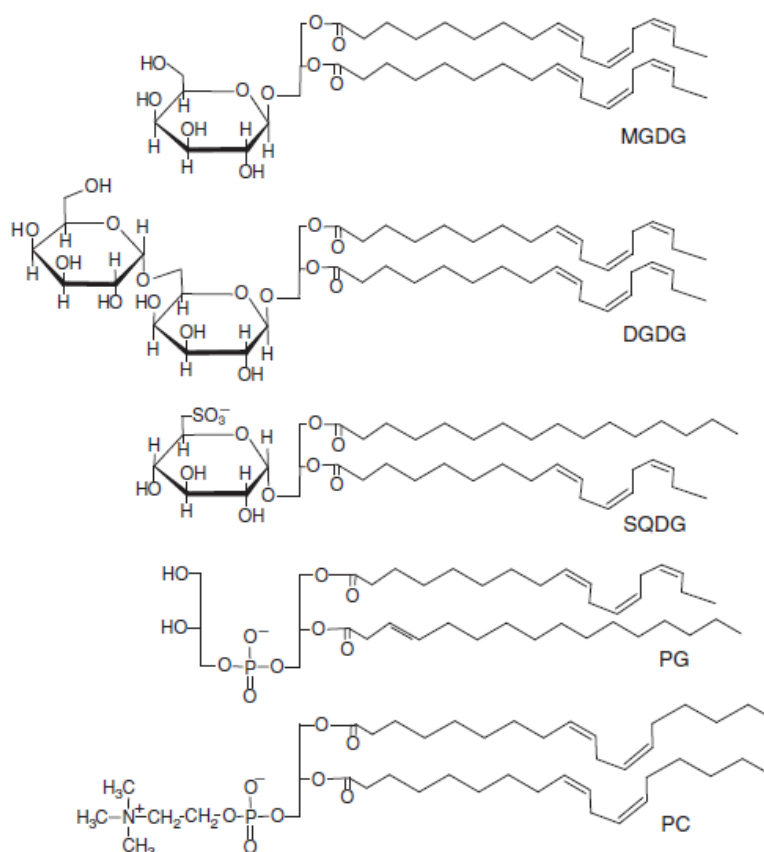


Figure 10. Constituants lipidiques des membranes de chloroplastes. Adapté d'après (Andersson et al., 2009). Légende : MGDG, monogalactosyldiacylglycérol ; DGDG, digalactosyldiacylglycérol ; SQDG, sulfoquinovosyldiacylglycérol ; PG, phosphatidylglycérol ; PC, phosphatidylcholine.

La distribution de ces composés lipidiques diffère entre les feuillets interne ou externe de la bicouche (Tableau 1.) et selon que le thylakoïde soit empilé ou non (Staehelin et al., 1996). Pour exemple, 70% du phosphatidylglycérol se retrouve dans le feuillet externe tandis que 95% du sulfoquinovosyldiacylglycérol est localisé dans le feuillet interne. De plus, le ratio MGDG:DGDG est d'environ 2.5 dans les granum tandis qu'il est de 1.2 dans les thylakoïdes stromatiques (Staehelin et al., 1996).

Tableau 1. Composition lipidique des membranes thylakoïdales. Adapté d'après (Staehelin et al., 1996).

| Lipide | % par rapport aux lipides totaux ¹ | Charge formelle à pH 7 | Localisation dans la bicouche lipidique |
|--------|---|------------------------|---|
| MGDG | 46 | 0 | Feuillet externe (stroma) |
| DGDG | 29 | 0 | Feuillet externe (stroma) |
| SQDG | 10 | (-) | Feuillet interne (lumen) |
| PG | 11 | (-) | Feuillet externe (stroma) |
| PC | 4 | (+ -) | ? |

Légende: MGDG, monogalactosyldiacylglycerol ; DGDG, digalactosyldiacylglycérol ; SQDG, sulfoquinovosyldiacylglycérol ; PG, phosphatidylglycérol ; PC, phosphatidylcholine.

¹Valeurs moyennes obtenues sur des thylakoïdes d'épinard, de tabac et de pois.

²Valeurs moyennes obtenues sur des thylakoïdes d'épinard, de maïs, de laurier-rose et de soja.

4. Rôles des chloroplastes dans les réponses aux stress

En conditions lumineuses, les chloroplastes sont les plus grands producteurs de ROS, largement impliqués dans les réponses de défense des plantes (Farooq et al., 2019). C'est aussi dans cet organite que sont produites de nombreuses oxylipines dont notamment les arabidopsides et les précurseurs de l'acide jasmonique. Enfin, le chloroplaste est capable de communiquer avec les gènes du noyau, par signalisation rétrograde. Cet organite joue donc un rôle pivot essentiel entre croissance (c.f. photosynthèse et métabolisme primaire) et immunité chez les plantes.

Suite à des stress (a)biotiques, la composition lipidique des membranes chloroplastiques varie considérablement (Upchurch, 2008). Par exemple, la détection de pathogènes ou de blessures mécaniques par la plante engendre la formation et la libération d'acide linoléique (18:3) chloroplastiques, précurseurs de l'acide jasmonique, ce qui altère la composition lipidique de la membrane (Upchurch, 2008). Il a également été montré que les galactolipides présents dans ces membranes peuvent être oxydés en oxylipines (dont les arabidopsides), suite à la formation de (dn)OPDA à partir des chaînes lipidiques (Song et al., 2021). De plus, les MGDGs et DGDGs non oxydés présents dans les membranes des chloroplastes et certains arabidopsides peuvent subir des acylations suite à des stress (a)biotiques (Vu et al., 2014; Song et al., 2021). Enfin, il a été reporté que suite au froid, à la chaleur et à la sécheresse; le niveau de saturation des acides gras varie afin d'atténuer les effets de ces stress (Li, Liu, et al., 2020). En particulier, l'augmentation des teneurs chloroplastiques en acides triénoïques augmente la tolérance des plantes au froid et, à l'inverse, la tolérance aux températures élevées est grandement accrue lorsque la plante diminue ces teneurs (Upchurch, 2008).

Ces nombreuses modifications de la structure des membranes des chloroplastes en conditions de stress pourraient ainsi impacter leur intégrité et leurs nombreuses fonctions (Deleu et al., 2014). En effet, il a été démontré que lorsque les plantes sont sujettes à des stress abiotiques, l'appareil photosynthétique subit des changements structuraux et métaboliques. À terme, ceci peut conduire à la perte d'intégrité et à une modification de la fluidité des membranes des chloroplastes ainsi qu'à une diminution de l'activité photosynthétique (Li, Liu, et al., 2020). De plus, il a été suggéré que les galactolipides pourraient avoir un rôle direct dans le bon déroulement de la photosynthèse (Dörmann et al., 2002; Li, Liu, et al., 2020; Yu et al., 2020); la modification de leur structure de par leur acylation ou leur oxydation en arabidopsides pourrait dès lors affecter la capacité photosynthétique des chloroplastes.

De plus, la taille des chloroplaste et des thylakoïdes diminue significativement lorsque la plante est infectée par *Botrytis*, lorsqu'elle devient sénescence ou encore lorsqu'elle est trop exposée à la lumière (Zechmann, 2019).

En outre, les chloroplastes peuvent être la cible d'effecteurs pathogéniques. Par exemple, plus d'une dizaine de protéines de *P. syringae*, parmi le répertoire de base comprenant 30-40 effecteurs que produit cette bactérie, ciblent cet organite (Littlejohn et al., 2020). Cette stratégie permettrait d'accroître la virulence des pathogènes en inhibant par exemple la production de ROS et la réponse hypersensible subséquente. De plus, l'infection provoque le repositionnement des chloroplastes et la formation de stromules qui pourraient faciliter la signalisation rétrograde (Littlejohn et al., 2020).

Objectifs

Comme décrit précédemment, le chloroplaste est un organe qui possède un rôle central dans la coordination des réponses immunitaires des plantes, notamment par la production d'oxylipines comme par exemple l'acide jasmonique. Ces 20 dernières années, de nombreuses études ont également montré que de grandes quantités d'arabidopsides sont produites à partir des lipides présents dans les membranes des chloroplastes, lorsque certaines plantes, *A. thaliana* notamment, subissent des stress variés. Mieux comprendre les rôles de ces molécules est l'une des clés de la compréhension des mécanismes d'adaptation incroyablement complexes des plantes.

La structure des arabidopsides formés dans les membranes chloroplastiques en conditions de stress est fort différente de celle des lipides non oxydés natifs. Dès lors, il est possible que la formation d'arabidopsides modifie les propriétés des membranes de ces chloroplastes (ou des thylakoïdes). Le premier objectif de ce travail était donc d'analyser et de comparer les propriétés des chloroplastes et des thylakoïdes stressés, c'est-à-dire ayant accumulé des arabidopsides, avec des chloroplastes (ou des thylakoïdes) non-stressés (i.e. témoins négatifs).

D'autre part, malgré le fait que les substrats (i.e. MGDGs et DGDGs) et certaines enzymes responsables de la synthèse des arabidopsides se trouvent dans les membranes chloroplastiques, il n'existe que peu d'informations concernant la localisation exacte de ces arabidopsides au sein des différentes membranes des chloroplastes. Le deuxième objectif de ce travail de fin d'études était donc de déterminer la localisation sub-cellulaire des arabidopsides, au sein du chloroplaste.

Afin de répondre à ces deux objectifs, il a fallu, d'une part, cultiver puis soumettre les plants d'*A. thaliana* à un stress biotique capable d'induire la formation d'arabidopsides et, d'autre part mettre au point et optimiser un protocole d'isolation des chloroplastes. Ces chloroplastes ont ensuite été soit analysés directement soit fractionnés en thylakoïdes, enveloppes, stroma et plastoglobules puis analysés. En parallèle à ces manipulations, les arabidopsides A, B, D, E et G ont été extraits et quantifiés.

Matériel et méthodes

Une liste des réactifs ainsi que de leur abréviation, du fabricant et de la pureté correspondants se trouve en annexe (Annexe 1).

I. Production de plants d'*Arabidopsis thaliana* L.

Lors de ce travail, les plantes utilisées étaient des *Arabidopsis thaliana*, soit le type sauvage *Columbia 0* (*Col-0*) soit les lignées transgéniques suivantes : *AvrRpm1/Col-0* ou *AvrRpm1/rpm1.3* (Andersson et al., 2006b).

A. thaliana AvrRpm1/Col-0 possède un transgène codant pour l'effecteur AvrRpm1 de *P. syringae*, le promoteur de celui-ci étant inductible à la dexaméthasone (Dex). L'effecteur AvrRpm1 est reconnu par la protéine RPM1 de la plante, ce qui induit la réponse hypersensible (Mackey et al., 2002b) et la production subséquente d'arabidopsides (Andersson et al., 2006b) (Annexe 2.). Le mutant *AvrRpm1/rpm1.3* est capable de produire l'effecteur AvrRpm1 après induction à la dexaméthasone, mais ne produit pas la protéine RPM1 et n'est donc pas capable de reconnaître l'effecteur (Andersson et al., 2006b). *A. thaliana Col-0* ne produit pas la protéine AvrRpm1.

Une quinzaine de graines d'*A. thaliana* ont été semées par pot (6x7x7 cm) de façon homogène dans du terreau universel (Chassart) tamisé et mélangées à du sable de rivière (3:1 (v/v)). Dès l'apparition des cotylédons, les plantes ont été cultivées avec une photopériode de 9h pendant 6 à 9 semaines.

II. Induction, extraction et analyse des arabidopsides

Le but de cette partie était d'induire la formation et l'accumulation d'arabidopsides dans les plants d'*A. thaliana* suite à un stress. Ces arabidopsides ont ensuite été extraits, purifiés et analysés en HPLC-MS afin de permettre leur détection et/ou leur quantification.

1. Induction du stress

Le stress a été induit par pulvérisation homogène d'une solution de dexaméthasone (Dex) (2 mM avec 0.005% (v/v) Silwett®) (Andersson et al., 2006a) sur les feuilles d'*A. thaliana AvrRpm1/Col-0*. Le temps optimal d'extraction après induction à la Dex (i.e. temps permettant d'obtenir des teneurs en arabidopsides maximales) a été déterminé après différents temps d'induction (t = 0 ; 1 ; 2 ; 3 ; 4 ; 5 et 6 h ; n=3).

Trois témoins négatifs correspondant à des plantes non stressées présentant des concentrations en arabidopsides faibles ont également été analysés: *Col-0*, *AvrRpm1/Col-0*, tous deux sans pulvérisation de dexaméthasone et *AvrRpm1/rpm1.3* avec pulvérisation de dexaméthasone.

Par soucis de simplicité, la plante stressée (i.e. *AvrRpm1/Col-0* avec Dex) et les trois témoins négatifs seront repris sous le terme « 4 modalités » pour la suite de ce travail. De plus, les abréviations suivantes seront utilisées par la suite afin de simplifier la lecture : *Col-0* (« Col0 »), *AvrRpm1/Col-0* non pulvérisé (« RPM1 »), *AvrRpm1/Col-0* pulvérisé (« RPM1 avec Dex ») et *AvrRpm1/rpm1.3* pulvérisé (« RPM13 avec Dex ») (Figure 11.).

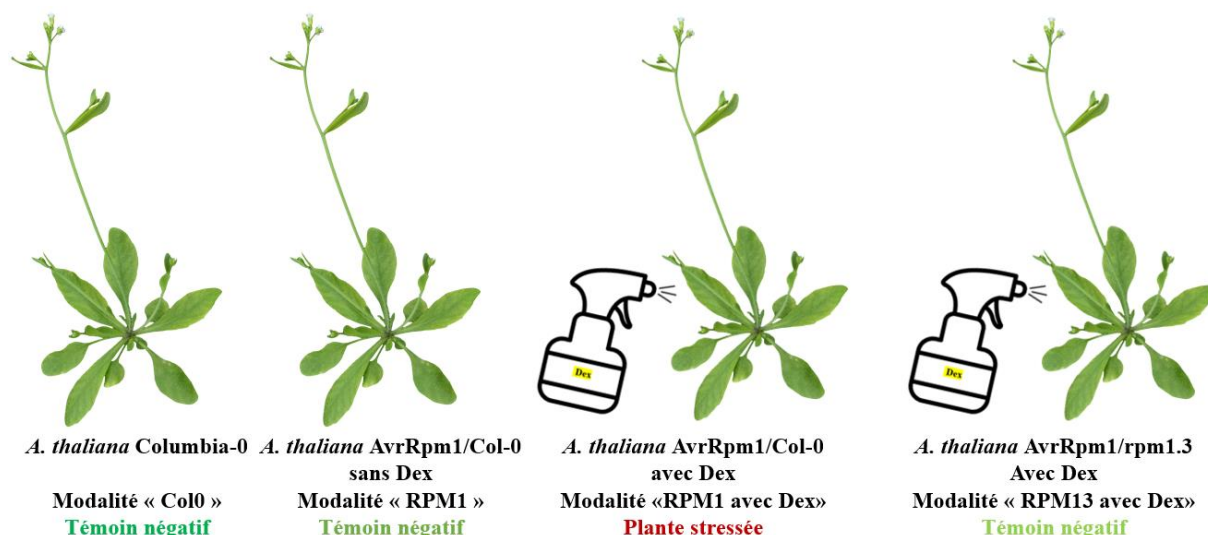


Figure 11. Illustration et abrégations des modalités de plants d'*A. thaliana* utilisés dans le cadre de ce travail. Code de couleur utilisé pour la partie Résultats et Discussion.

2. Extraction des lipides et séparation des arabidopsides sur colonne SPE

Le protocole suivant est basé sur (Genva et al., 2020).

a) Sur feuilles d'*A. thaliana*

Pour chacune des 4 modalités (n=8), environ 0.2 g de feuilles d'*A. thaliana* ont été mis dans un tube contenant 2.5 mL d'isopropanol et immédiatement placés pendant 5 minutes dans un bain marie préalablement chauffé à 100°C. Le tout a été séché sous flux d'azote. Les lipides ont été extraits en ajoutant 2 mL de solution d'extraction des lipides (chloroforme:méthanol:eau (1:2:0.8 (v:v:v)) contenant 0.025% (w:v) de BHT) et en vortexant. Les tubes ont été placés 30 min au bain à ultrasons puis refroidis 30 min au réfrigérateur.

L'extraction liquide-liquide a été réalisée par ajout de 0.5 mL de chloroforme et de 0.5 mL de K₂SO₄ 380 mM puis le tout a été vortexé. La phase apolaire a été récupérée dans un nouveau tube. La fraction aqueuse a été réextraite 2 fois de plus après ajout de 0.5 mL de chloroforme. La fraction apolaire totale a été mise à sécher sous flux d'azote puis le tout a été re-solubilisé dans 0.5 mL de chloroforme.

Les lipides polaires contenant les arabidopsides ont ensuite été purifiés sur colonne SPE (CHROMABOND® SiOH ; 3 mL ; 500 mg ; 45 µm), préalablement conditionnée avec 3 mL de chloroforme. Après le dépôt de l'échantillon, la première fraction a été éluée avec 2 mL de chloroforme:acétone (9:1 (v:v)). La deuxième fraction contenant les arabidopsides (i.e. fraction galactolipides) a ensuite été éluée avec 8 mL d'acétone:méthanol (9:1 (v:v)). Enfin, la colonne a été lavée avec 3 mL de méthanol. Les volumes d'éluants ont été optimisés afin que tous les arabidopsides se retrouvent dans la fraction des galactolipides (Genva et al., 2020).

Cette fraction a été mise à sécher sous flux d'azote, solubilisée dans 800 µL d'acétonitrile:eau (30:70 (v:v), filtrée (0.45 µM) puis diluée 20x (si nécessaire)).

Pour chaque échantillon végétal, la matière sèche a été déterminée. Environ 0.3 g de feuilles ont été séchées pendant 24h dans une étuve ventilée à 70°C et pesées.

b) Sur chloroplastes isolés et sous-fractions de chloroplastes :

Pour chacune des 4 modalités, l'extraction a également été réalisée sur les chloroplastes isolés (*c.fr 5. Isolation et analyse des chloroplastes*) ainsi que sur les fractions de chloroplastes obtenus suite au fractionnement sub-cellulaire (*c.fr 7. Localisation sub-cellulaire des arabidopsides*). Le protocole est le même qu'au point 4. b) i. avec les modifications suivantes :

- Après évaporation de l'isopropanol sous flux d'azote, les tubes ont été lyophilisés pour éliminer l'eau provenant du tampon contenant les fractions de chloroplastes.
- Les volumes pour l'extraction liquide-liquide ont été modifiés afin d'éviter la formation d'émulsions: 10 mL de chloroforme (à chaque extraction) et 1 mL de K_2SO_4 sont utilisés.
- La standardisation est réalisée par rapport aux lipides totaux extraits (avant séparation sur colonne SPE) et non par rapport à la matière sèche.

3. Détection et dosage des arabidopsides par HPLC-IT-MS

Les arabidopsides contenus dans les échantillons ont été quantifiés suivant la méthode validée par (Genva et al., 2020).

Les arabidopsides présents dans la fraction de lipides polaires obtenue suite à la SPE ont été séparés sur un HPLC Agilent 1100 équipé d'une pré-colonne et d'une colonne C18 (Inerstil ODS-3 ; 3 μ m ; 3x100 mm). La température de la colonne était de 40°C, le volume d'injection de 5 μ L et le débit de 0.25 mL/min. Le solvant A était de l'eau mQ et le solvant B un mélange acétonitrile:eau mQ (85:15 (v:v)). Tous deux contenaient 0.2% d'acide formique et 12 mM de formate d'ammonium. Un post-temps de 2 min a été laissé entre chaque injection. Les détails du gradient sont repris dans le tableau ci-dessous (*Tableau 2*) :

Tableau 2. Gradient de solvants pour l'analyse HPLC-MS des arabidopsides

| Temps [min] | % solvant A | % solvant B |
|-------------|-------------|-------------|
| 0 | 47 | 53 |
| 1 | 47 | 53 |
| 18 | 0 | 100 |
| 36 | 0 | 100 |
| 42 | 47 | 53 |
| 45 | 47 | 53 |

Les arabidopsides ont été détectés à l'aide d'un spectromètre de masse ion trap (IT-MS) (Esquire HCT, Bruker Daltonics), par nébulisation électrostatique (ESI) en mode positif. La tension du capillaire a été réglée à - 4500 V, la pression du nébuliseur à 50 psi et le débit de gaz sec à 10 L/min. Les paramètres de la MS, optimisés selon le type d'arabidopside, ont été repris tels que définis dans (Genva et al., 2020) (*Annexe 3*).

Les données ont été traitées avec le DataAnalysis software fourni par Bruker Daltonics. Les arabidopsides ont été identifiés par leur temps de rétention, le ratio masse/charge d'un de leurs adduits (sodium ou ammonium ; ion de quantification) ainsi que le ratio masse/charge de leur ion de confirmation (*Tableau 3*) comme décrit dans (Genva et al., 2020).

Ce dernier correspond à la perte d'un (pour les arabidopsides A et B) ou deux (pour l'arabidopside D) groupement(s) galactose et à la perte d'un groupement galactose et d'une chaîne acylée OPDA pour les arabidopsides E et G. Les arabidopsides ont été quantifiés selon l'aire du pic de l'adduit de l'ion de quantification et grâce à des droites de calibrage réalisées avec des standards purs d'arabidopsides (*Annexes 4 à 8*).

Tableau 3. Quantification des arabidopsides A, B, C, D et E. Adapté d'après (Genva et al., 2020).

| | Arabidopside A | Arabidopside B | Arabidopside D | Arabidopside E | Arabidopside G |
|--|---|---|---|---|---|
| Ion de quantification | 792.5 [M + NH ₄] ⁺ | 820.5 [M + NH ₄] ⁺ | 987.5 [M + Na] ⁺ | 1071.6 [M + Na] ⁺ | 1099.7 [M + Na] ⁺ |
| Ion de confirmation | 613.4 [M-C ₆ H ₁₀ O ₅] ⁺ | 641.4 [M-C ₆ H ₁₀ O ₅] ⁺ | 641.4 [M-2 C ₆ H ₁₀ O ₅] ⁺ | 613.4 [M-C ₆ H ₁₀ O ₅ -C ₁₈ H ₂₆ O ₂] ⁺ | 641.4 [M-C ₆ H ₁₀ O ₅ -C ₁₈ H ₂₆ O ₂] ⁺ |
| Gamme de validité de la calibration [μM] | 0.10 - 25 | 0.20 - 100 | 0.40 - 50 | 0.40 - 50 | 0.30 - 21.75 |
| Droite/courbe de calibration | y = 4841348 x | y = 3094103 x | y = 1890172 x | y = 156021 x ² + 4833033 x | y = 745747 x ² + 9751706 x |
| Coefficient de détermination (R ²) | 0.9991 | 0.9974 | 0.9993 | 1.0000 | 0.9997 |

III. Isolation des chloroplastes et des thylakoïdes

Afin de permettre leur analyse subséquente, un protocole d'isolation de chloroplastes et de thylakoïdes a été mis au point à partir de feuilles d'*A. thaliana*.

Différentes solutions ont été préparées la veille de l'isolation :

- Tampon d'isolation des chloroplastes (2xTIC) : 40 mM HEPES-KOH pH8, 10 mM d'EDTA, 10 mM d'EGTA, 0.66 M de sorbitol et 1% (w:v) de BSA dans de l'eau distillée.
- Tampon HMS : 50 mM d'HEPES-KOH pH 8, 3 mM de MgSO₄ et 0.3 M de sorbitol.
- Gradients de Percoll®: Dans un tube à centrifuger de 50 mL, 15 mL de Percoll sont mélangés avec 15 mL de 2xTIC. 5 mg de glutathion (forme réduite) sont ajoutés, et le tube est centrifugé à 43.000 g pendant 30 min sans frein (4°C ; swinging-bucket) (Beckman Coulter Allegra J-5).
- Tampon d'éclatement (LB) : 10 mM MES-NaOH pH 6.5 et 5 mM MgCl₂.
- Tampon TrE (1x) (voir 5.b)
- Tampon DPH : 50mM Tricine-KOH pH 8.0, 15 mM NaCl, 5 mM MgCl₂ et 50 mM sorbitol dans de l'eau distillée.

La veille de l'isolation des chloroplastes et des thylakoïdes, les plantes ont été mises en chambre noire afin de consommer les granules d'amidon qui, sinon, auraient endommagé les chloroplastes lors de leur isolation. Toutes les étapes qui suivent ont été réalisées le plus rapidement possible, en chambre froide ou sur glace. Les solutions et matériels ont été refroidis préalablement à 4°C. Tout pipetage de chloroplastes a été réalisé avec des tips dont le bout a été coupé afin de réduire le cisaillement.

Chaque échantillon de chloroplastes et de thylakoïdes obtenus ci-dessous a été analysé au microscope afin d'avoir une preuve visuelle de l'isolation propice de ceux-ci.

1. Isolation des chloroplastes

Le protocole suivant est basé sur les articles de (Chu et al., 2011; Flores-Pérez et al., 2017).

Environ 5 g de feuilles d'*A. thaliana* ont été broyées pendant 3 secondes (IKA® A11 basic) en présence de 15 mL de 1xTIC. Le ratio masse de matière fraîche par rapport au volume d'1xTIC était d'environ 1:10 (w:v). Après filtration à travers une double couche de Miracloth® (22-25 μm), la matière végétale résiduelle a été de nouveau broyée deux fois successivement avec les mêmes paramètres. La solution obtenue a ensuite été centrifugée (1.000 g ; 5 min ; 4°C ; rotor fixe) (Beckman Coulter Avanti J-5).

Après élimination du surnageant, le pellet de chloroplastes a été suspendu dans 8 mL d'1xTIC et la suspension obtenue a été déposée très doucement sur le gradient de Percoll. Ce dernier a été centrifugé (7.700 g ; 10 min ; 4°C ; swinging-bucket) sans frein. La figure 12. illustre le résultat attendu.

Les chloroplastes intacts, contenus dans la bande inférieure ont été récupérés dans un tube à centrifugeuse de 50 mL. 25 mL de tampon HMS y ont été ajoutés et le tout a été centrifugé (1.000 g ; 5 min ; 4°C ; fixe). Le pellet de chloroplastes a été resuspendu doucement dans 1 à 2 mL de tampon HMS à 4°C puis immédiatement analysé.



Figure 12. Gradient de Percoll® avec séparation des chloroplastes fragmentés (bande supérieure) et intacts (bande inférieure).

2. Détermination de la concentration en chlorophylle totale des chloroplastes isolés

La concentration en chlorophylle des échantillons obtenus a été déterminée comme décrit par (Chu et al., 2011). 100 μ L de chloroplastes isolés dans du HMS ont été mélangés à 100 μ L d'eau distillée et 800 μ L d'acétone. Le tout a été vortexé puis centrifugé (Eppendorf Minispin®) 5 min à 3.000 g à température ambiante. Ensuite, le surnageant a été transféré dans une cuvette PMMA de 1 mL pour analyse au spectrophotomètre (Ultrospec 7000) à 652 nm. Le blanc correspond à de l'acétone à 80% (v:v) dans de l'eau distillée. La concentration en chlorophylle totale est donnée par la relation suivante (Chu et al., 2011):

$$[Chlorophylle_{totale}] = \frac{A_{652} * 500}{36} \left[\frac{mg_{Chlorophylle\ totale}}{mL} \right]$$

3. Isolation des thylakoïdes

Les thylakoïdes ont été obtenus à partir des chloroplastes intacts isolés dans du HMS (5.a) sur base des protocoles décrits par (Yamamoto et al., 2004; Chu et al., 2011) avec quelques modifications.

Les chloroplastes intacts ont été centrifugés à 1.500 g pendant 5 min et à 4°C avec un rotor à angle fixe. Le pellet a été resuspendu dans 2 mL de tampon d'éclatement, vortexé et incubé sur glace et à l'obscurité pendant 5 min. Le tout a été centrifugé à 3.000 g pendant 5 min à 4°C. Le pellet a alors été lavé avec 1 mL de tampon DPH ou de tampon TrE (pour l'analyse de la fluidité membranaire ou du potentiel zéta, respectivement) puis centrifugé à 3.000 g pendant 3 min à 4°C. Cette étape de lavage a été répétée puis le pellet a été resuspendu dans du tampon DPH ou TrE à une concentration de 1 $mg_{chlorophylle\ totale}/mL$.

IV. Localisation sub-cellulaire des arabidopsides

L'enveloppe externe, le stroma, les thylakoïdes et les plastoglobules ont été obtenus suite à la fragmentation des chloroplastes intacts isolés précédemment. Chaque fraction a ensuite été analysée en HPLC-IT-MS, comme détaillé précédemment, afin de déterminer la présence ou l'absence d'arabidopsides.

Ce protocole est basé sur l'isolation des chloroplastes décrite précédemment et sur (Jarvis, 2011; Bouchnak et al., 2018).

En parallèle à cette manipulation, la matière sèche (n=5 ; prise d'essai $\approx 0.3\text{g}$; 24 h ; 70°C) des échantillons végétaux a été déterminée.

1. Schéma général du fractionnement

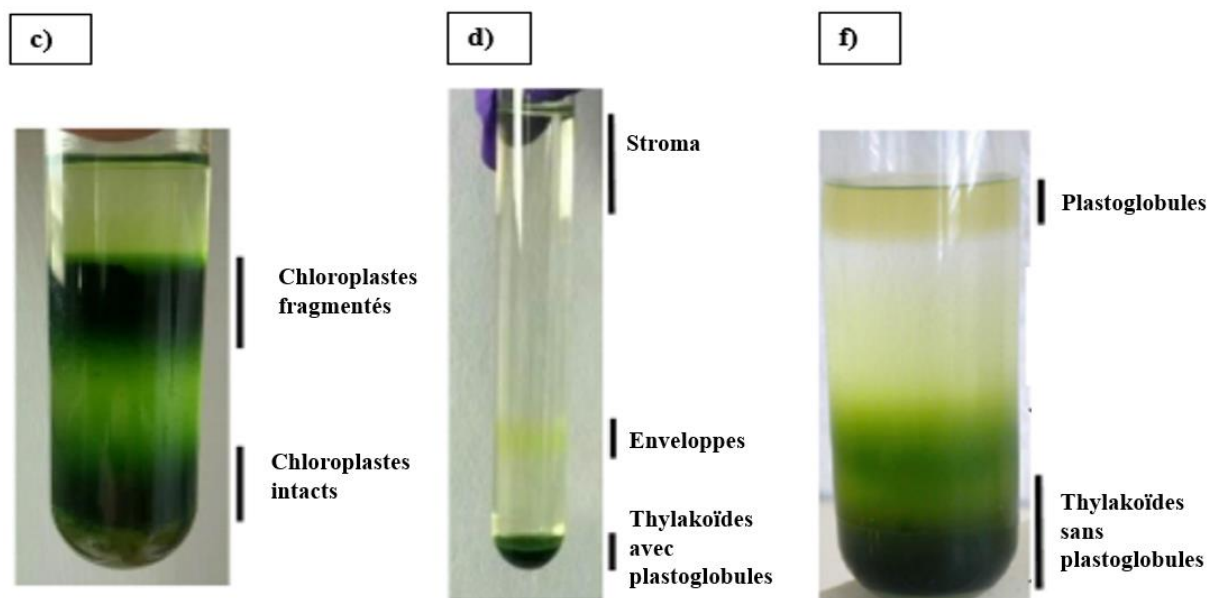


Figure 13. Résultats attendus dans les gradients de séparation des différentes étapes d'isolation. c) Séparation des chloroplastes fragmentés et intègres sur gradient de Percoll. d) Séparation des fractions stroma, enveloppes et thylakoïdes sans plastoglobules sur gradient de saccharose. F) Séparation des thylakoïdes et des plastoglobules sur gradient de saccharose.

2. Solutions à préparer

Différentes solutions ont été préparées la veille du fractionnement :

- **2xTIC, Tampon HMS et gradients de Percoll®** (c.fr Isolation des chloroplastes).
- Solution stock de tampon **TrE (10x)** : 50 mM Tricine-KOH pH 7.5, 2 mM EDTA et 2 mM de DTT.
- **Tampon Tre (1x) avec saccharose 45% (w:v)**.

Différentes solutions ont été préparées le jour du fractionnement :

- **Tampon d'éclatement des chloroplastes (TEC)** : Solution hypotonique contenant des inhibiteurs de protéases : MOPS 10 mM pH 7.8, MgCl_2 4 mM, PMSF 1 mM, BHH 1 mM et acide caproïque 0.5 mM. Garder sur glace jusqu'à utilisation.
- **Gradients de saccharose I** : MOPS 10 mM pH 7.8, MgCl_2 4 mM dans différentes concentrations de saccharose (1.6 mL à 0.93 M, 1.3 à mL 0.6 M et 1 mL à 0.3 M). Le gradient est formé en superposant doucement ces solutions en partant de la plus concentrée à la moins concentrée, dans des tubes à ultracentrifugation SW28 UltraClear.
- **Tampon de lavage des membranes (TLM)** : MOPS 10 mM pH 7.8, PMSF 1 mM, BHH 1 mM et acide caproïque 0.5 mM. Garder sur glace jusqu'à utilisation.
- **Gradients de saccharose II** : Tricine-KOH pH 7.5 5 mM, 2 mM EDTA, 2 mM DTT dans différentes concentrations de saccharose (1 mL à 38%, 1 mL à 20%, 0.7 mL 15% et 3 mL 5% (w:v)).

3. Isolation des chloroplastes et purification sur gradients de Percoll®

Entre 400 et 500 g de feuilles fraîches ont été récoltées, broyées dans du tampon 1xTIC en respectant le ratio 1:10 (w:v) comme précisé lors de l'isolation des chloroplastes, puis filtrées à travers une double couche de Miracloth® dans des tubes à centrifuger adéquats. La matière broyée a été récupérée puis le broyage et la filtration ont été répétés deux fois. Le filtrat a alors été distribué équitablement dans des tubes à centrifuger puis centrifugé à 1.500 g pendant 5 min, à 4°C sans frein.

Chaque pellet a été resuspendu dans 25 mL d'1xTIC. 10 mL de resuspension ont été déposés doucement sur chaque gradient de Percoll puis le tout a été centrifugé à 7.700 g pendant 10 min à 4°C sans frein dans une centrifugeuse à « swinging-bucket ».

La bande de chloroplastes intacts a été récupérée comme décrit précédemment et 25 mL de tampon HMS ont été ajoutés. Le tout a été centrifugé à 1.000 g pendant 5 min à 4°C avec frein à l'aide d'un rotor à angle fixe.

4. Fractionnement des chloroplastes et purification des sous-compartiments sur gradient de saccharose

Les culots de chloroplastes ont été suspendus et mélangés ensemble dans 6 mL de TEC, vortexés et incubés pendant 5 min. 1.5 mL de solution de chloroplastes lysés a été déposé sur chaque gradient de saccharose I préformé puis les gradients ont été centrifugés à 70.000 g pendant 1 h à 4°C sans frein dans un rotor à swinging-bucket (ultracentrifugeuse Beckman Coulter Optima MAX-XP).

La phase « stroma » a été récupérée en pipetant doucement la phase supérieure de chaque gradient (Figure 13. d)).

5. Lavage et concentration de l'enveloppe et des membranes thylakoïdales

Ensuite, la phase « enveloppe » a été récupérée en perforant la paroi du tube à l'aide d'une seringue et d'une aiguille (Figure 13. d)). Les différentes phases « enveloppe » ont été mélangées ensemble puis ramenées à un volume de 10 mL avec du TLM.

Enfin, les surnageants restants ont été éliminés et les culots « thylakoïdes » (Figure 13. d)) resuspendus dans 2 mL de TLM par tube. Les resuspensions ont été mélangées ensemble et le volume ramené à 10 mL avec du TLM.

Les tubes ont été centrifugés à 110.000 g pendant 1h à 4°C sans frein dans un rotor à angle fixe. Le culot « enveloppe » a alors été resuspendu avec 100 µL de TLM.

6. Séparation des plastoglobules associés aux membranes thylakoïdales

Le culot « thylakoïde » a été resuspendu dans 4 mL de tampon Tre-Saccharose 45%. La séparation des plastoglobules et des thylakoïdes a été réalisée dans un homogénéiseur glass potter de 15 mL (≈ 20 aller-retours) puis par sonication pendant 2 min. 1 mL d'homogénat a été versé dans chaque tube d'ultracentrifugation. Les gradients de saccharose II ont ensuite été déposés doucement par-dessus dans l'ordre décroissant de concentration en saccharose. Les tubes ont été centrifugés à 100.000 g pendant 16 h à 4°C sans frein dans un rotor swinging-bucket.

Pour chaque gradient, des fractions de 300 µL ont été récupérées. La fraction jaunâtre et trouble surnageante correspond aux plastoglobules tandis que le culot vert foncé contient les thylakoïdes.

V. Analyses sur les chloroplastes et des thylakoïdes isolés

1. Microscopie

Les chloroplastes isolés intacts ou fragmentés (dans le cadre de l'isolation des thylakoïdes) ont été visualisés à l'aide de différents microscopes. Premièrement, un microscope à polarisation Leika DM2700P avec grossissement 100x. Deuxièmement, un microscope à fluorescence Carl Zeiss à grossissement 100x et muni d'un laser bleu (488 nm) permettant d'observer la fluorescence due aux chlorophylles contenues dans les thylakoïdes.

2. Cytométrie en flux

L'activité photosynthétique, la perméabilité membranaire et la taille des populations de chloroplastes issus de plantes stressées et des témoins négatifs ont été comparés par cytométrie en flux (CF).

La CF permet, par le biais de la diffusion de la lumière et de la fluorescence, d'analyser les propriétés de milliers de chloroplastes par seconde avec une grande précision (Rodriguez et al., 2012). La détection de la diffusion de la lumière se fait soit de face (angles de 0° à $\pm 13^\circ$) (i.e. « Forward Scattering » ou FSC, lié à la taille de la particule) soit perpendiculairement (angles de 90° à $\pm 13^\circ$) (i.e. « Side Scattering » ou SSC, lié à la « complexité » de la surface de la particule).

Toutes les analyses ont été réalisées à l'aide du cytomètre en flux BD Accuri™ C6, avec un « threshold » de 80.000 sur le FSC-H, en mode « medium fluidics ». Par échantillon, un total de 30.000 événements ont été analysés. Le traitement des données et la génération de graphiques a été réalisée à l'aide du programme Python FlowCal (Castillo-Hair et al., 2016) et des logiciels FCS Express 7 et CFlow Plus Analysis.

Les échantillons ont été préparés en diluant les chloroplastes isolés dans du tampon HMS, selon le nombre d'événements cible de l'appareil. Tout d'abord, pour les mesures basées sur la diffusion de la lumière, le FSC-A a permis d'analyser la **taille** des chloroplastes. Ensuite, pour les mesures basées sur la fluorescence de l'échantillon, l'excitation est réglée à 488 nm (Rodriguez et al., 2012) et l'émission est détectée à plusieurs longueurs d'ondes, grâce à des filtres optiques, selon le type de mesure (Tableau 4) :

Tableau 4. Paramètres du cytomètre en flux BD Accuri™ C6

| Filtre optique | Longueur d'onde de détection |
|----------------|------------------------------|
| FL3 | > 670 nm |
| FL4 | 675/25 nm |

L'**activité photosynthétique** des chloroplastes a été évaluée indirectement grâce à l'auto-fluorescence (Tableau 4. FL3 et FL4) des chlorophylles a et b (*Figure 14.*) contenues dans ses membranes thylakoïdales.

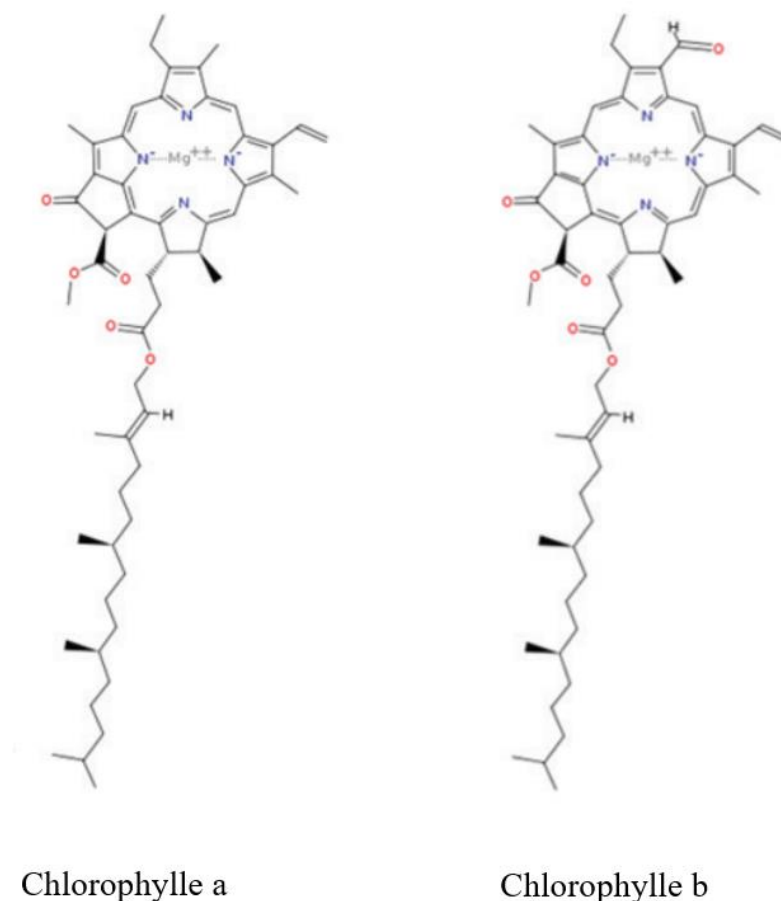


Figure 14. Structures des chlorophylles a et b. Adapté d'après (Guidi et al., 2017).

3. Potentiel zêta

Le potentiel zêta (ζ) renseigne sur la charge portée par les membranes des chloroplastes et des thylakoïdes, dans un solvant donné.

Les mesures du potentiel zêta ont été réalisées à l'aide du Malvern Zetasizer Nano series. Les chloroplastes (ou thylakoïdes) isolés ont été dilués dans le tampon HMS (ou dans le tampon trE), selon l'atténuation propice. Les cuvettes ont été équilibrées à 25°C pendant 4 min. Le potentiel zêta de chaque échantillon représente la moyenne de 4 mesures avec 10 points d'acquisition par mesure.

4. Fluidité membranaire

Le 1,6-diphényl-1,3,5-hexatriène (DPH) et un de ses dérivés, le TMA-DPH (Figure 15.) sont deux sondes fluorescentes capables de se partitionner dans le domaine lipidique des membranes biologiques telles que celles des thylakoïdes. Le DPH, plus apolaire s'insère entre les chaînes carbonées des lipides tandis que le TMA-DPH, plus polaire, de par son cation triméthylammonium, s'insère moins profondément dans la membrane, c'est-à-dire plus proche des têtes polaires. Les deux sondes n'ont qu'un rendement de fluorescence faible dans des milieux polaires. Dès lors, la fluorescence émise par des suspensions aqueuses de membranes provient presque exclusivement de ces sondes insérées dans les régions hydrocarbonées de ces membranes (Ford, 1983).

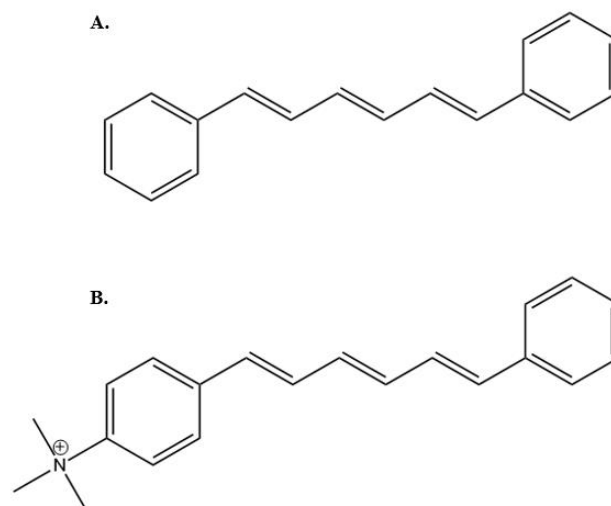


Figure 15. Structures du DPH et du TMA-DPH.

Les mesures du taux de polarisation de fluorescence des sondes DPH et TMA-DPH ont été réalisées à l'aide d'un spectromètre à fluorescence Perkin Elmer LS50B équipé de polarisateurs. Ce taux de polarisation de fluorescence est lié à la fluidité membranaire. En effet, au plus les galactolipides permettent à la sonde de bouger, au plus la membrane sera fluide, au plus la lumière sera dépolarisée et au plus ce taux de polarisation sera faible (Lentz, 2018).

Le protocole suivant est basé sur les articles de (Yamamoto et al., 2013; Lebecque, 2019; McCourt et al., n.d.). Les échantillons de thylakoïdes à une concentration de 1 mg de chlorophylle/mL de tampon ont été dilués 10 fois puis incubés avec la sonde DPH (40 min ; 5 μ M DPH, à partir d'une solution mère à 3 mM dans du THF ; 20°C ; obscurité) ou TMA-DPH (5 min ; 5 μ M TMA-DPH, à partir d'une solution mère à 3 mM dans de l'eau mQ ; 20°C ; obscurité) dans un volume de 3 mL. L'analyse s'est faite dans une cuvette en quartz équilibrée pendant 5 min à 20°C, avec agitateur, dans un support thermostatisé. Les longueurs d'onde d'excitation et d'émission ont été fixées à 360 et 460 nm, respectivement (Figure 16.). Le slit d'excitation était de 2.5 nm tandis que le slit d'émission variait entre 10 à 20 nm.

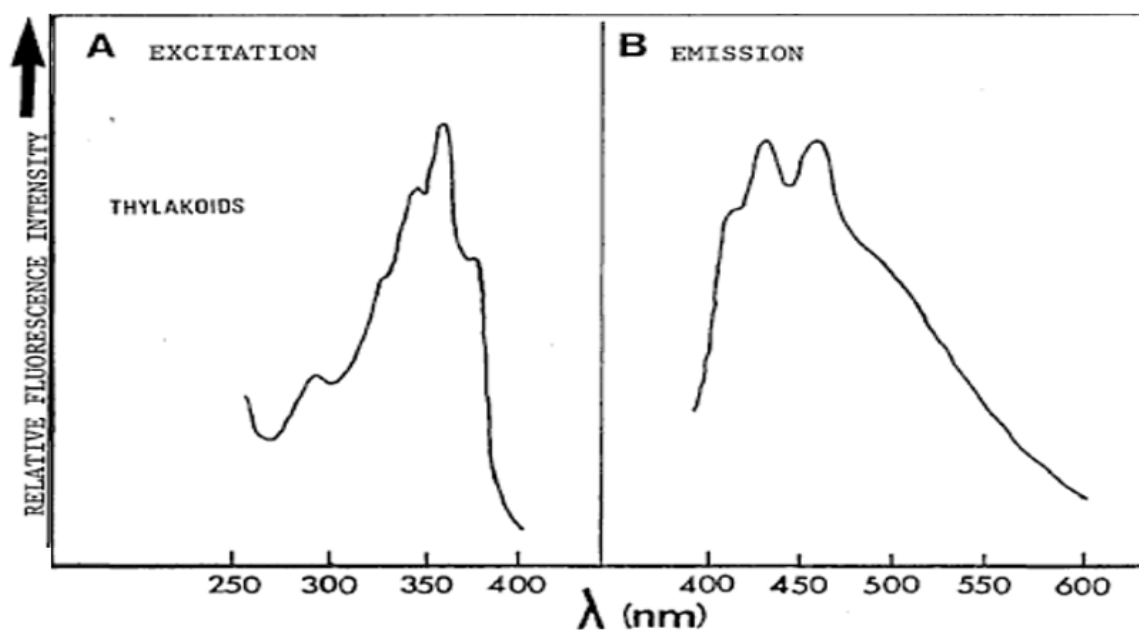


Figure 16. Spectres d'excitation et d'émission de la DPH incorporée dans des thylakoïdes. Adapté d'après (Ford, 1983)

Le taux de polarisation de fluorescence a été mesuré par l'appareil selon l'équation :

$$\text{Taux de polarisation de fluorescence : } P = \frac{I_{VV} - I_{VH} * Z}{I_{VV} + I_{VH} * Z}$$

$$\text{Facteur de correction : } Z = \frac{I_{HV}}{I_{HH}}$$

Les mesures ont été corrigées en soustrayant les intensités obtenues dans le blanc, c'est-à-dire l'échantillon non incubé. Les indices renseignent sur la position des polarisateurs. Par exemple, I_{VH} indique un polarisateur d'excitation vertical et un polarisateur d'émission horizontal. P et Z sont des nombres adimensionnels. Le facteur de correction compense les intensités d'excitations horizontale et verticale légèrement différentes (Barber et al., 1984). En d'autres mots, il compense la transmission inégale du système entre polarisation horizontale et verticale (Lin et al., 2011).

VI. Statistiques

Les statistiques ont été réalisées à l'aide du logiciel Minitab 20. Les résultats obtenus ont tous été exprimés en moyenne +/- écart-type. Des tests de normalité (Anderson-Darling) et d'égalité des variances (Bartlett) ont été conduits sur les échantillons. Toutes les populations-parents des échantillons testés étaient normales ($p > 0.05$) et leurs variances égales ($p > 0.05$). La comparaison des moyennes a été réalisée à l'aide de tests t de Student, deux par deux. Les tests statistiques ont été considérés comme significatifs (*), hautement significatifs (**) et très hautement significatifs (***), lorsque la p-valeur du test était inférieure à 0,05 ; 0,01 et 0,001, respectivement.

Résultats et discussion

Pour rappel, les objectifs de ce travail de fin d'études étaient de comparer les propriétés de chloroplastes contenant ou non des arabidopsides, c'est-à-dire issus de plants d'*A. thaliana* stressés ou non, respectivement. De plus, la localisation sub-cellulaire des arabidopsides produits au sein des chloroplastes a été investiguée.

I. Induction de la formation d'arabidopsides à la dexaméthasone

1. Détermination du temps optimal suite à l'induction

Suite à la reconnaissance d'un transgène codant pour un effecteur de *P. syringae* étant exprimé après pulvérisation avec une solution de dexaméthasone, la plante transgénique *A. thaliana* « RPM1 » produit des arabidopsides. Une étude a montré que les teneurs maximales de chaque arabidopside diffèrent dans le temps après l'induction du stress (Kourtchenko et al., 2007). Dès lors, il s'agit de trouver un temps optimal après l'induction du stress pour lequel, idéalement, chaque arabidopside est observé en quantités maximales.

Les résultats (Figures 17. et 18.) ont montré que dans les 6 premières heures suite à la reconnaissance de la protéine AvRpm1 de *P. syringae*, l'arabidopside D est produit en quantité plus importante que les autres arabidopsides et son optimum se situe aux alentours de 2h. De plus, chaque classe d'arabidopside (i.e. MGDGs oxydés, DGDGs oxydés et acyl-MGDGs oxydés) y est également retrouvée. Pour la suite de ce travail, le temps optimal de formation des arabidopsides a donc été fixé à 2h suivant l'induction à la dexaméthasone. En effet, ce temps permet d'induire le stress, d'isoler des chloroplastes et de comparer les propriétés de ceux-ci, le tout dans la même journée ; ce qui est nécessaire car les chloroplastes isolés se dégradent rapidement et leur analyse doit être réalisée le plus rapidement possible.

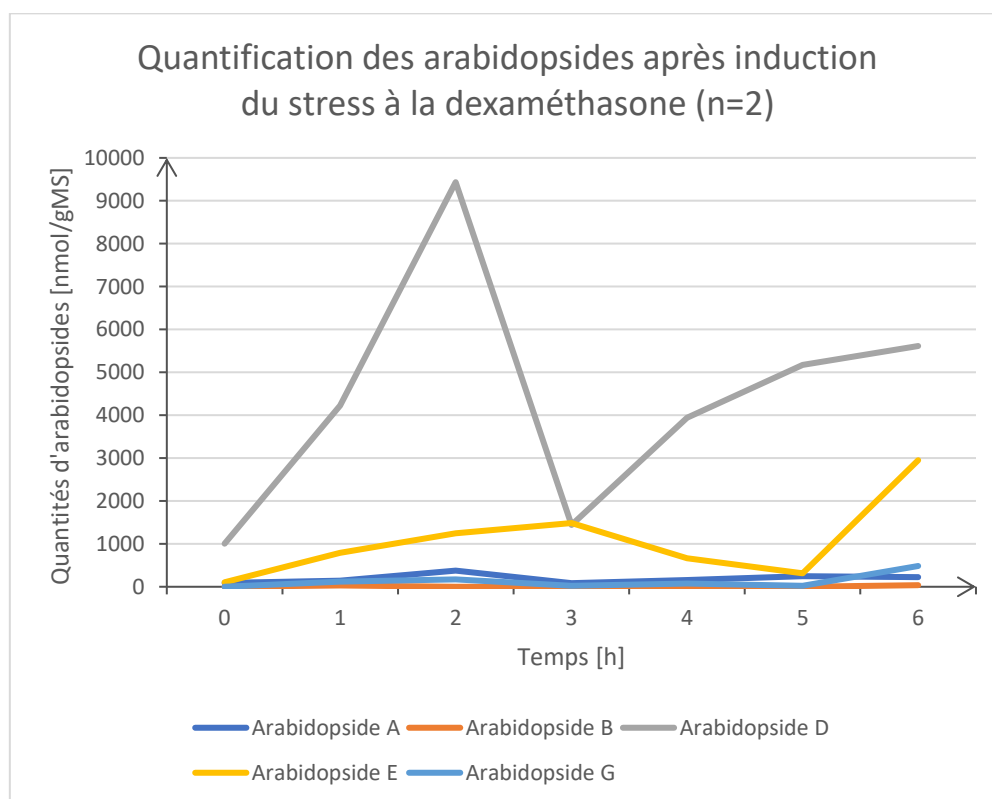


Figure 17. Dosage par HPLC-MS des arabidopsides A, B, D, E et G formés au cours du temps, suite à l'induction avec une solution de dexaméthasone (2 mM) des plantes *A. thaliana* RPM1.

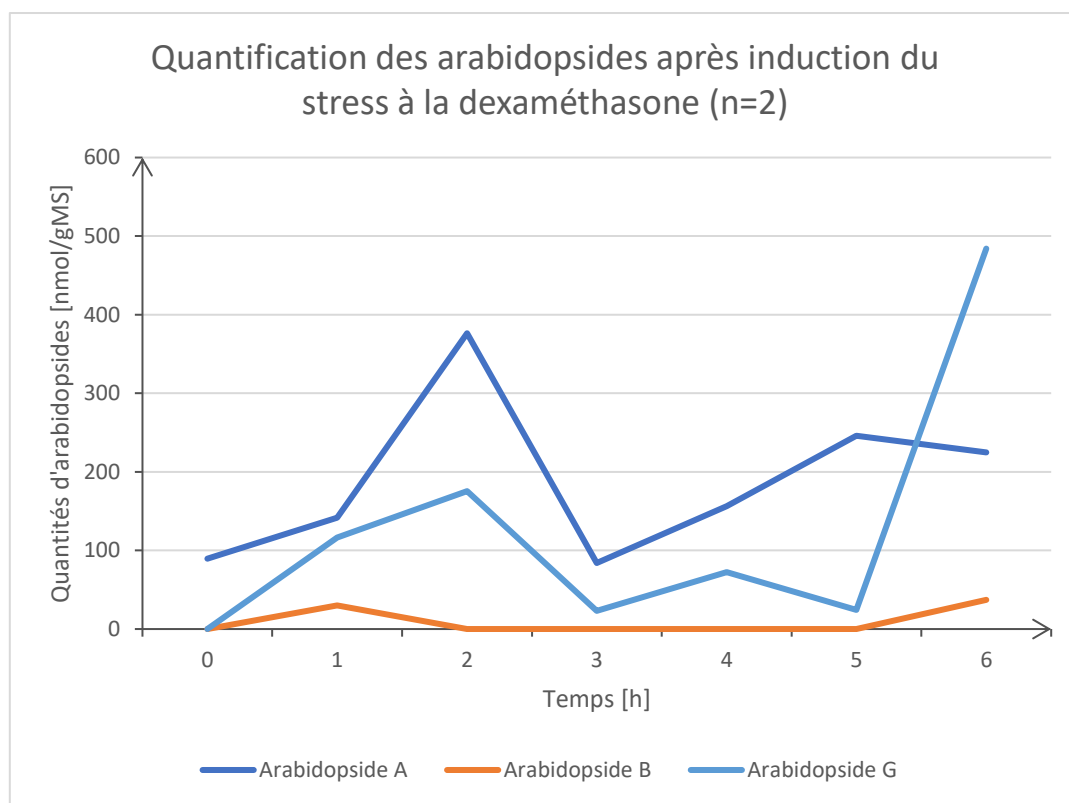


Figure 18. Dosage par HPLC-MS des arabidopsides A, B et G formés au cours du temps, suite à l'induction avec une solution de dexaméthasone (2 mM) des plantes *A. thaliana* RPM1.

2. Quantification des arabidopsides contenus dans les feuilles d'*A. thaliana*

Suite à la détermination du temps optimal d'induction, il a été vérifié que les teneurs en arabidopsides étaient supérieures dans les plantes ayant été induites à la dexaméthasone (i.e. « RPM1 avec Dex ») que dans les témoins négatifs n'ayant pas été stressés (i.e. « Col0 », « RPM1 » et « RPM13 avec Dex »). Ainsi, deux heures après la pulvérisation de dexaméthasone sur les plants « RPM1 avec Dex » et « RPM13 avec Dex », les teneurs en arabidopsides de feuilles fraîches des 4 modalités d'*A. thaliana* (n=8) ont été déterminées par HPLC-MS (Figure 19.).

Les résultats (Figure 19.) montrent que les arabidopsides A, D, E et G sont retrouvés en quantités plus importantes dans les plantes stressées que dans les témoins négatifs. La molécule ayant été retrouvée en plus grande quantité dans les plantes stressées est l'arabidopside D, ce qui est cohérent avec les résultats préliminaires présentés ci-dessus (Figures 17. et 18.). Néanmoins, pour la modalité « Col0 », des teneurs similaires en arabidopside A sont observées par rapport à la plante stressée. Pour les deux autres témoins négatifs, l'arabidopside A n'a pas pu être quantifié car son signal était trop faible. L'arabidopside B n'a soit pas été détecté soit le signal obtenu était inférieur à la limite de quantification, et ce qu'importe la modalité. Les arabidopsides E et G n'ont pu être quantifiés uniquement dans les plants stressés (i.e. « RPM1 avec Dex »). De plus, l'arabidopside G, n'a que rarement été détecté.

Les teneurs en arabidopsides des feuilles des témoins négatifs sont nettement plus faibles que celles du « RPM1 avec Dex » (i.e. stressée), démontrant bien l'impact de ce stress sur la formation des arabidopsides.

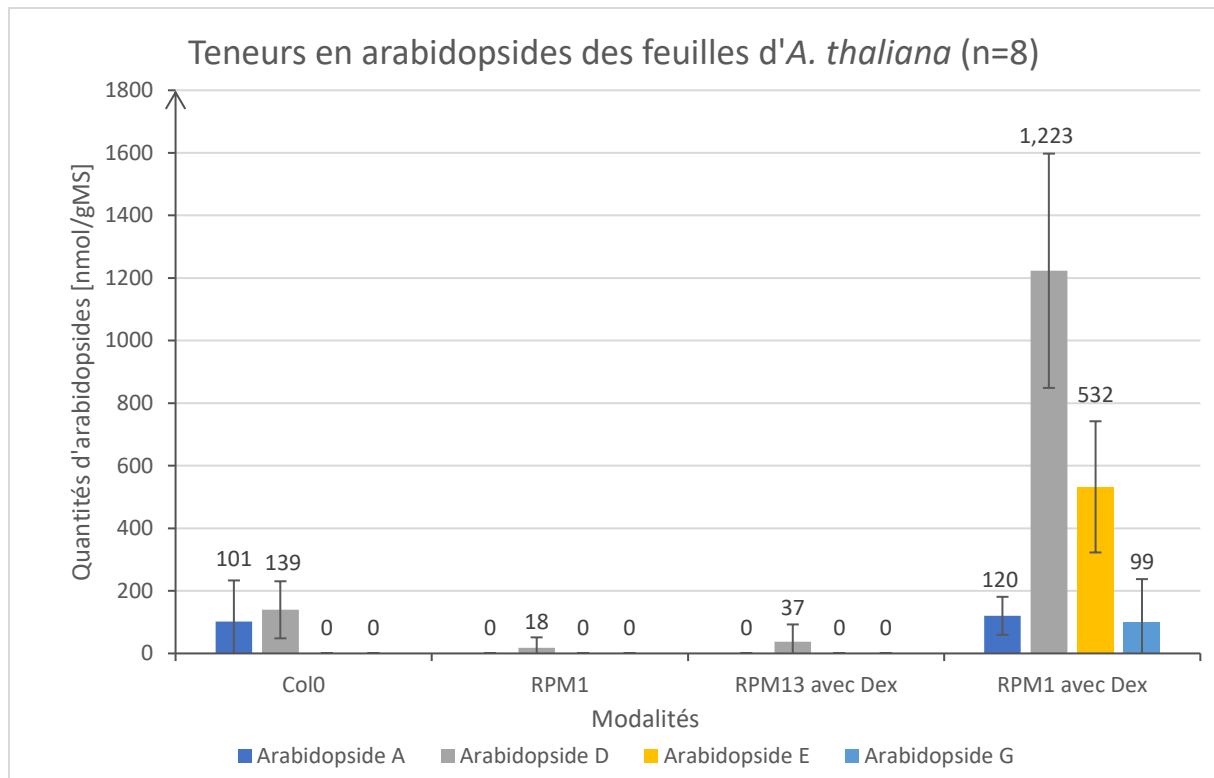


Figure 19. Teneurs en arabidopsides A, D, E et G des feuilles d'*A. thaliana* des 4 modalités.

II. Optimisation des protocoles d'isolation et de fractionnement des chloroplastes et thylakoïdes

Afin de pouvoir comparer les chloroplastes issus de plantes stressées ou non, il faut tout d'abord les isoler. C'est pourquoi, en attente du développement des plants d'*A. thaliana*, des tests préliminaires d'isolation de chloroplastes ont été réalisés sur du cresson de fontaine (*Nasturtium officinale*, Brassicaceae) qui a lui aussi la capacité former des arabidopsides en conditions de stress (Genva et al., 2020). Ces tests, basés sur des protocoles issus de la littérature, ont généré des chloroplastes mais soit non-intègres ou soit en quantité insuffisante (Figure 20.).

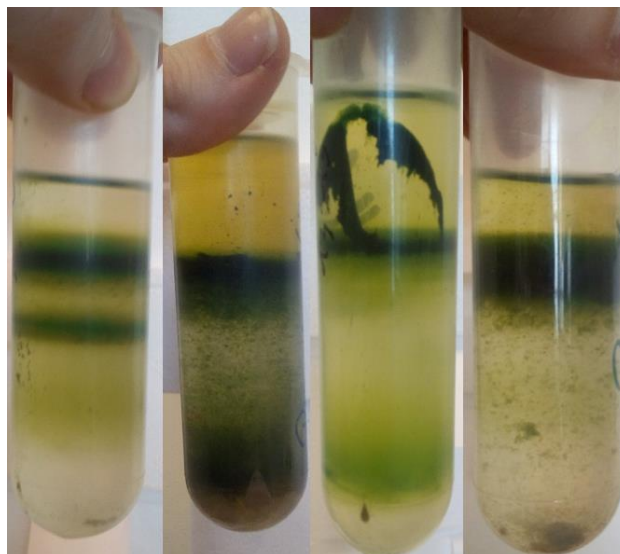


Figure 20. Tests préliminaires d'isolation des chloroplastes sur du cresson des fontaines (*Nasturtium officinale*).

Ce protocole a été optimisé en utilisant une centrifugeuse swinging-bucket plutôt qu'à angle fixe et en optimisant la quantité de matière fraîche utilisée ainsi que le rapport masse de matière fraîche sur volume de tampon (1xTIC). Le but de cette manipulation était d'obtenir des bandes de chloroplastes fragmentés (bande supérieure) et intacts (bande inférieure) bien séparées et exemptes d'impuretés. Le résultat de cette optimisation, sur du matériel frais d'*A. thaliana* cette fois-ci, est représenté ci-dessous (Figure 21.a) et montre que les chloroplastes intacts ont pu être bien séparés des chloroplastes fragmentés. Ces chloroplastes seront utilisés dans la suite de ce travail.

Ensuite, afin de comparer également les propriétés des thylakoïdes isolés à partir de plantes ayant accumulé ou non des arabidopsides, les thylakoïdes ont été isolés à partir de ces chloroplastes (Figure 21. c). Initialement, un protocole d'isolation de ces premiers par « freeze-thawing » a été testé (Block et al., 2018). Cette manière de faire a été remplacée par une incubation dans le « lysis buffer » (c.fr Matériel et Méthodes, III.3.) permettant un meilleur éclatement des chloroplastes, observé par microscopie, et ainsi un meilleur rendement en thylakoïdes.

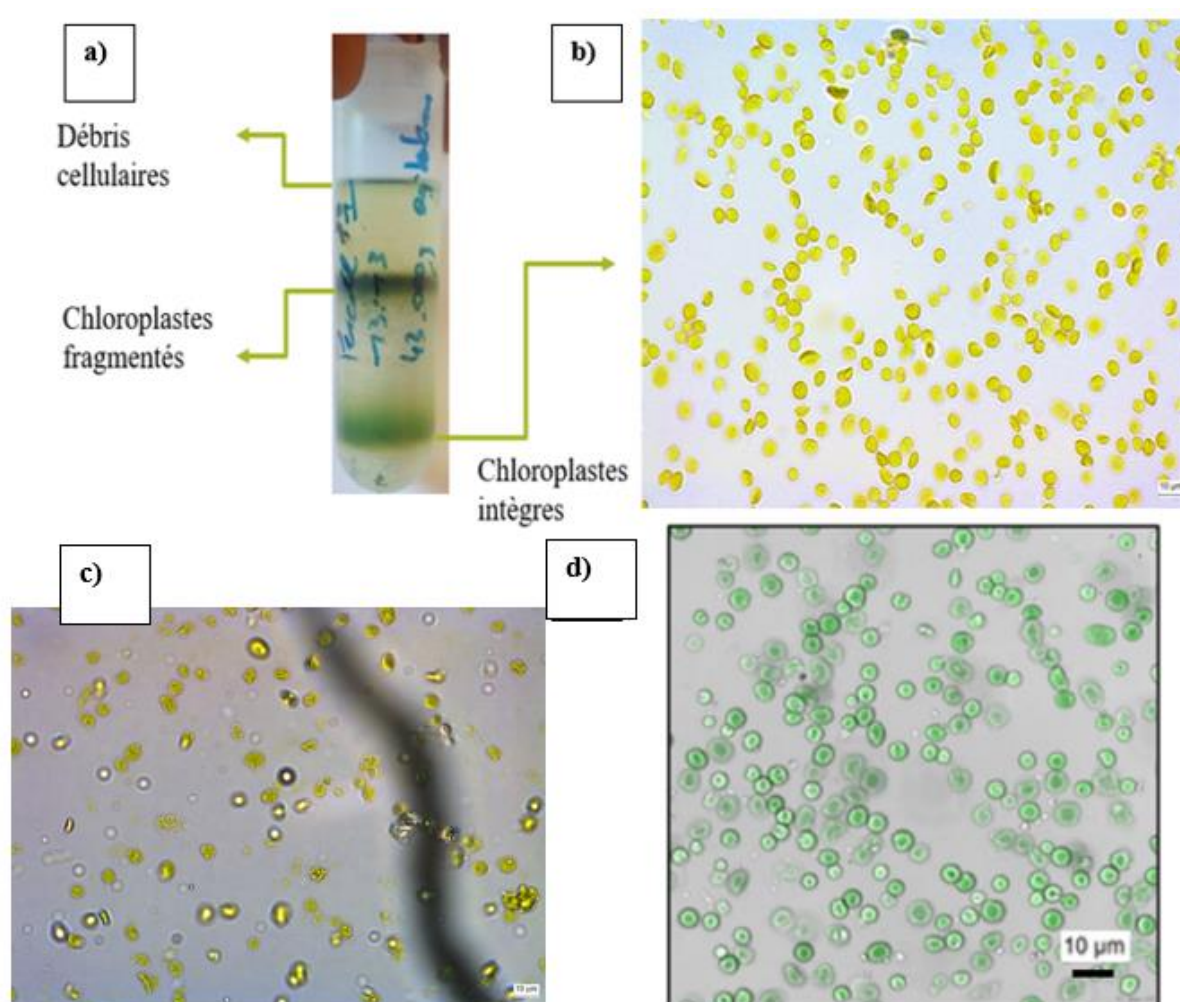


Figure 21. Gradient de Percoll obtenu avec le protocole d'isolation des chloroplastes optimisé. b) Visualisation des chloroplastes intègres d'*A. thaliana* au microscope (100x). c) Thylakoïdes isolés à partir des chloroplastes d'*A. thaliana* d) Comparaison des chloroplastes isolés avec ceux de (Bhattacharya et al., 2020).

III. Analyses sur les chloroplastes

Des études précédentes ont déjà montré qu'il était possible d'observer l'impact du stress sur les chloroplastes (Upchurch, 2008; Li, Liu, et al., 2020)upc. Afin de comparer les propriétés de chloroplastes ayant accumulé des arabidopsides ou non, des chloroplastes d'*A. thaliana* issus des 4 modalités ont été isolés et analysés. Ensuite, les mesures obtenues pour les plantes stressées (i.e. « RPM1 avec Dex »), dont il a été montré plus haut qu'elles contenaient plus d'arabidopsides que les témoins négatifs, ont été comparées par rapport à ces derniers.

Pour rappel, une modification de la structure des membranes chloroplastiques suite à la formation d'arabidopsides pourrait induire une modification de leur fonction. Mettre en évidence ces possibles modifications est précisément le but de ces analyses.

1. Cytométrie en flux

Les chloroplastes obtenus à partir des 4 modalités ont été analysés par cytométrie en flux (CF) (Figure 22.).

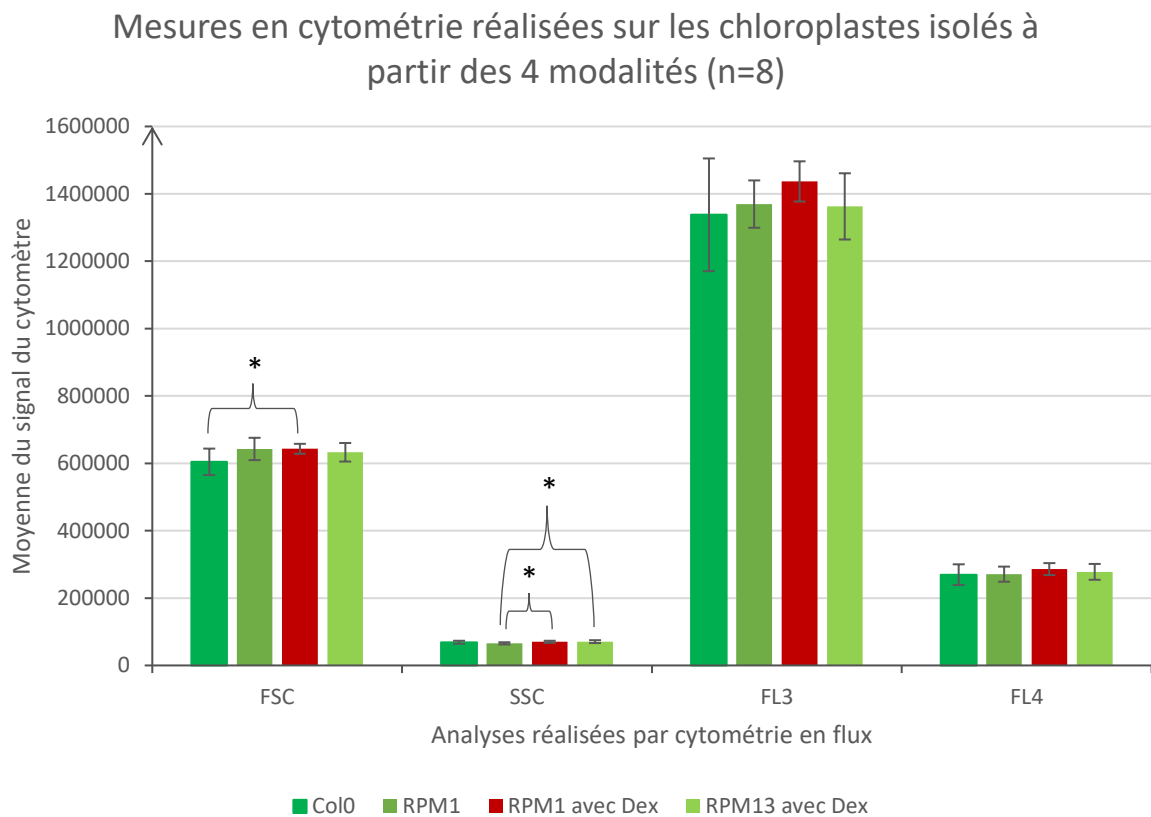


Figure 22. Moyennes et écart-types des mesures réalisées par cytométrie en flux sur les chloroplastes isolés à partir des 4 modalités. Pour chaque analyse (i.e. FSC, SSC, FL3 et FL4), la comparaison des moyennes a été réalisée à l'aide de tests *t* de Student, deux par deux. Les résultats des tests statistiques sont présentés sur le graphique. Ceux-ci ont été considérés comme significatifs (*), hautement significatifs (**) et très hautement significatifs (***), lorsque la *p*-valeur du test était inférieure à 0,05 ; 0,01 et 0,001, respectivement (c.fr détails aux points i. ii. et iii.). Légende : SSC, Sideward scattering ; FL, fluorescence ; FSC, Forward scattering ; Col0, type sauvage ; Dex, dexaméthasone (2 mM); RPM1, mutant *avrRpm1/Col-0* ; RPM13, mutant *avrRpm1/rpm1.3*.

a) Taille et morphologie des chloroplastes

La CF a été utilisée pour analyser la taille et de la morphologie des chloroplastes ayant accumulé ou non des arabidopsides dans leurs membranes, grâce au FSC et au SSC, respectivement. La superposition des histogrammes ((FSC;#chloroplastes) et (SSC;#chloroplastes), de chaque modalité et répétition (n=8), obtenus à partir des graphiques de densité (FSC;SSC) est reprise dans la figure ci-dessous (Figure 23.).

La comparaison des moyennes des 4 modalités 2 par 2 (test t de student à 2 échantillons) des tailles n'a pas donné de différence significative, sauf entre les modalités Col0 et RPM1 Dex2h (Figure 22.). Pour celles-ci, les chloroplastes issus d'*A. thaliana* ayant accumulé des arabidopsides présentent une augmentation de leur moyenne de FSC de 6,03% par rapport au témoin négatif Col0. Néanmoins, comme cette différence est faible et qu'il n'y a pas de différence significative entre les autres témoins négatifs et le RPM1Dex2h, les chloroplastes ayant accumulé des arabidopsides suite à un stress ne semblent pas présenter de différence de taille par rapport aux chloroplastes en ayant accumulé.

Il en est de même pour la morphologie (SSC) des chloroplastes, une augmentation significative de la moyenne de 6,49% a été mise en évidence pour la condition RPM1 Dex2h par rapport au témoin négatif RPM1. Cependant, comme cette différence est faible et qu'il n'y a pas de différence significative entre les autres témoins négatifs et le RPM1Dex2h, les chloroplastes ayant accumulé des arabidopsides suite à un stress ne semblent pas présenter de différence de morphologie par rapport aux chloroplastes en ayant accumulé. De fait, le stress, comme défini dans le cadre de ce travail, n'induit pas de modification ni de taille ni de morphologie des chloroplastes.

b) Activité photosynthétique

Comme le stress n'impacte pas la taille des chloroplastes, les pics des signaux récoltés par les filtres FL3 et FL4, qui correspondent à l'auto-fluorescence des chloroplastes, ont eux aussi été analysés tels que schématisé dans la figure 23. Ici encore, aucune différence significative entre les moyennes de fluorescence des 4 modalités, que ce soit pour le détecteur FL3 ou FL4 n'a été démontrée, (Figure 22.). Autrement dit, le stress tel qu'appliqué dans le cadre de ce travail ne modifie pas la fluorescence de la chlorophylle contenue dans les membranes thylakoïdales. Il serait intéressant d'étudier et de comparer l'activité photosynthétique de façon plus précise qu'indirectement à travers la fluorescence des chlorophylles, afin d'avoir une meilleure idée de l'impact de la réponse hypersensible et de la formation d'arabidopsides sur cette activité.

c) Discussion générale sur la CF

Aucune différence élevée n'a été mise en évidence pour chacun des paramètres mesurés sur les chloroplastes des 4 modalités. Soit, comme mentionné ci-dessus, La formation d'arabidopsides dans les chloroplastes en conditions de stress n'a pas d'impact sur ces paramètres, soit cet appareil n'est pas assez sensible que pour pouvoir mettre en lumière ce genre de différences.

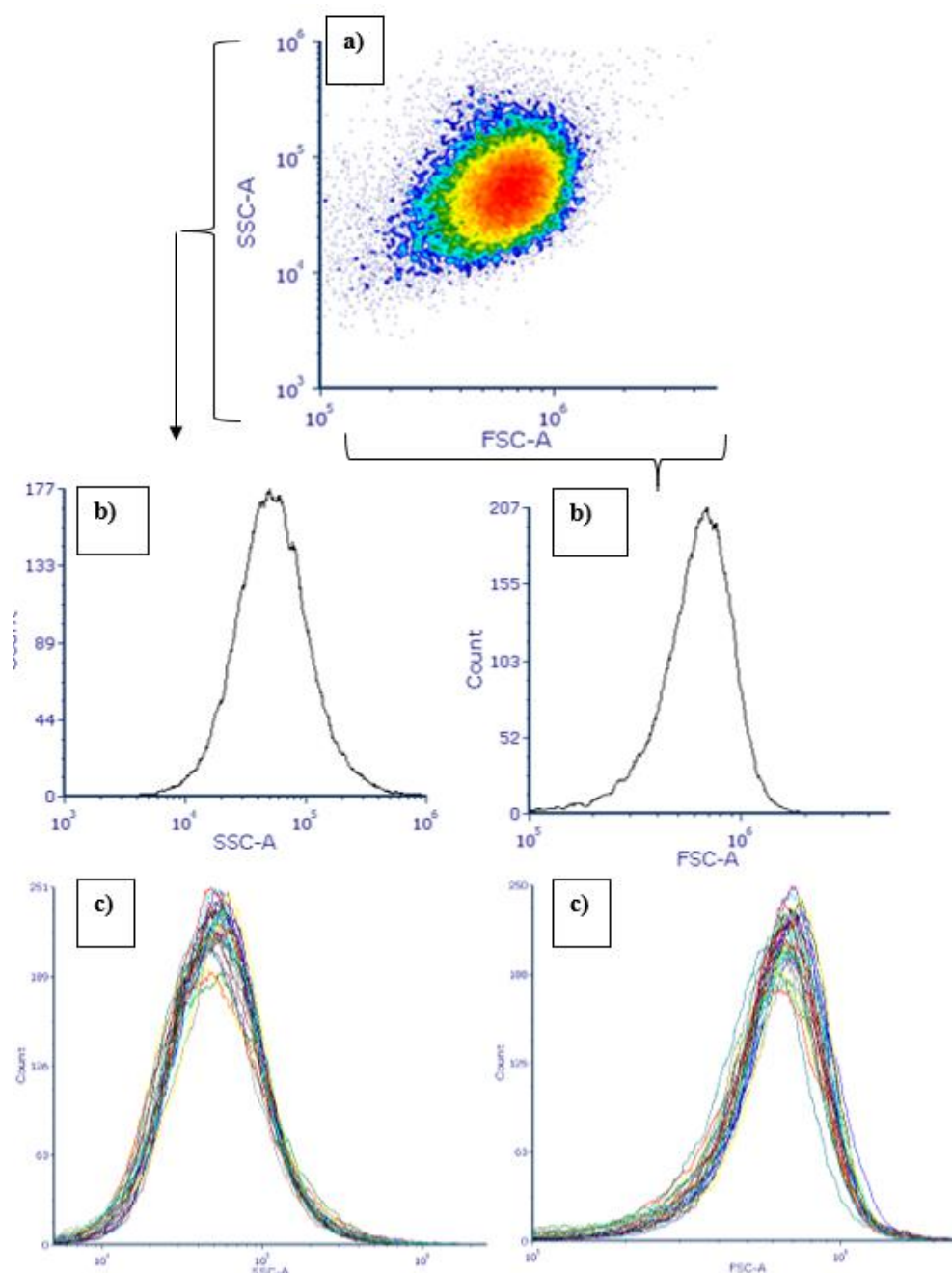


Figure 23. Résultats obtenus en CF. a) Exemple représentatif d'un graphique de densité b) Histogrammes obtenus à partir du graphique de densité. c) Superposition des histogrammes pour chaque modalité et pour chaque répétition.

2. Fluidité membranaire

La formation d'arabidopsides, dans les membranes thylakoïdales, à partir de MGDGs et de DGDGs, suite à un stress modifie la composition lipidique de celles-ci, ce qui pourrait se traduire par une modification de leur fluidité.

Les résultats (Figure 24.) montrent que les degrés de polarisation des sondes DPH sonde TMA-DPH, sont plus faibles pour les thylakoïdes isolés à partir de plantes stressées (RPM1 avec Dex) par rapport aux des témoins négatifs (Figure 24.). Pour la sonde DPH, qui s'insère plus profondément dans la bicouche lipidique (car moins polaire), les moyennes sont significativement différentes entre le témoin négatif « Col0 » et la plante stressée « RPM1 avec Dex » (diminution de 21.54%) et entre le témoin négatif « RPM1 » et la plante stressée « RPM1 avec Dex » (diminution de 27.89%).

Degré de polarisation des sondes insérées dans les membranes thylakoïdales (n=4)

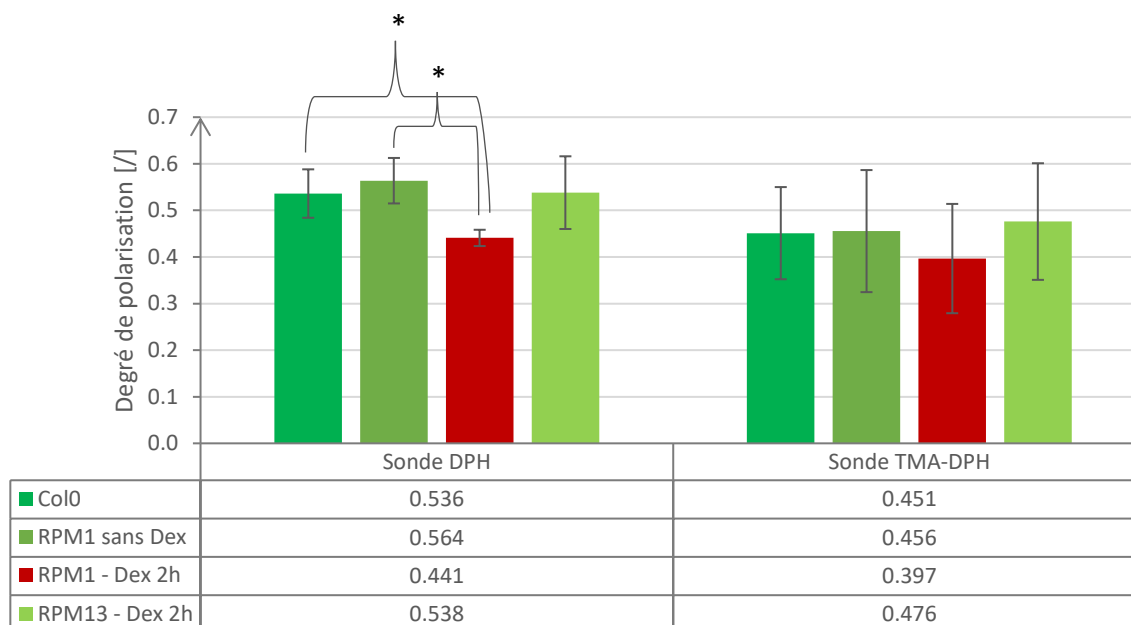


Figure 24. Comparaison du degré de polarisation de fluorescence de sondes (DPH et TMA-DPH) insérées dans les membranes thylakoïdales des témoins négatifs (en vert) et de la plante stressée (en rouge). Les résultats sont présentés en moyenne \pm écart-type pour chaque modalité. Les tests ont été répétés quatre fois par modalité. Des tests T de Student deux par deux ont permis d'établir la significativité ou non des différences entre moyennes.

Les résultats montrent donc que le degré de polarisation de la sonde DPH diminue de façon importante suite au stress, c'est-à-dire que la fluidité membranaire des thylakoïdes augmente suite à ce stress. Cette augmentation de la fluidité membranaire pourrait être causée par la formation des arabidopsides dans les membranes thylakoïdales en condition de stress. La localisation sub-cellulaire des arabidopsides dans ces membranes sera confirmée dans la dernière partie de ce travail. En ce qui concerne la sonde TMA-DPH, qui s'insère moins profondément (car plus polaire), ces différences ne sont pas significativement différentes mais la tendance reste similaire.

Les résultats indiquent donc que la fluidité membranaire des membranes thylakoïdales augmente majoritairement au niveau des queues hydrophobes suite au stress, tel que défini dans ce travail, et faiblement au niveau des têtes polaires.

3. Potentiel zêta

La mesure du potentiel zêta réalisée sur les chloroplastes et thylakoïdes isolés précédemment a permis de comparer leur charge de surface. Ci-dessous sont repris des exemples représentatifs de résultats obtenus lors des analyses de chloroplastes (Figure 25.) et de thylakoïdes (Figure 26.).

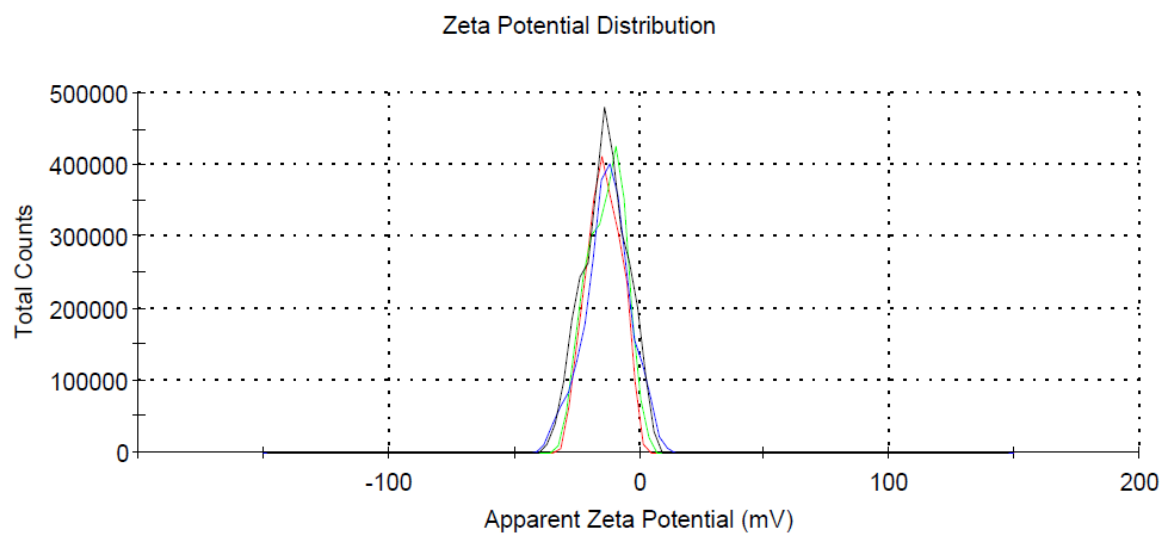


Figure 25. Exemple de graphique obtenu pour la mesure du potentiel zêta ($n=4$) des chloroplastes de RPM1.

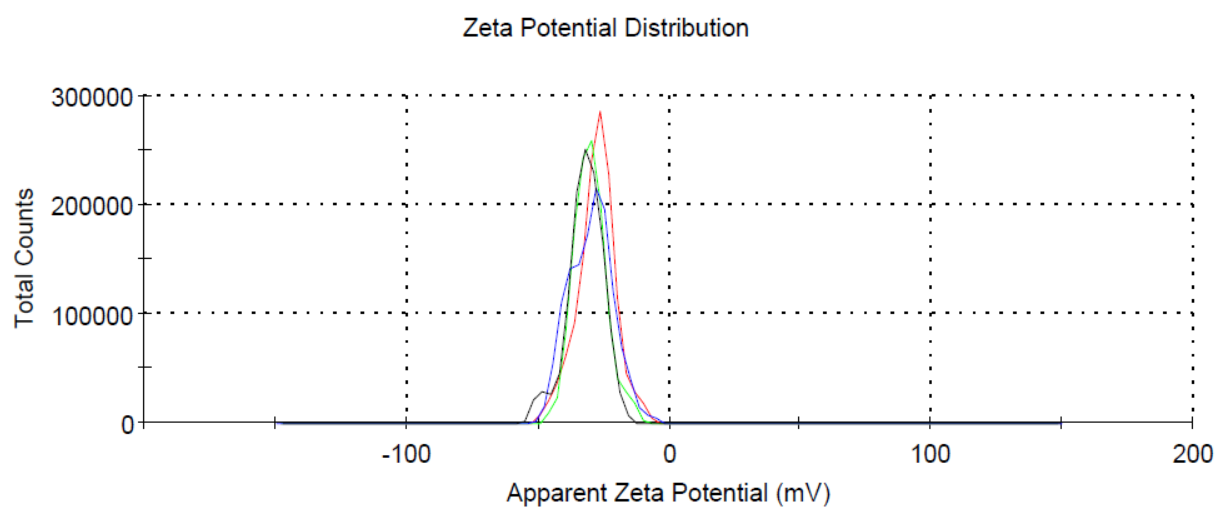


Figure 26. Exemple de graphique obtenu pour la mesure du potentiel zêta ($n=4$) des thylakoïdes de RPM1 – Dex 2h.

Les moyennes de potentiel zêta des chloroplastes et des thylakoïdes pour les quatre modalités ont été reprises dans le graphique ci-dessous (Figure 27.).

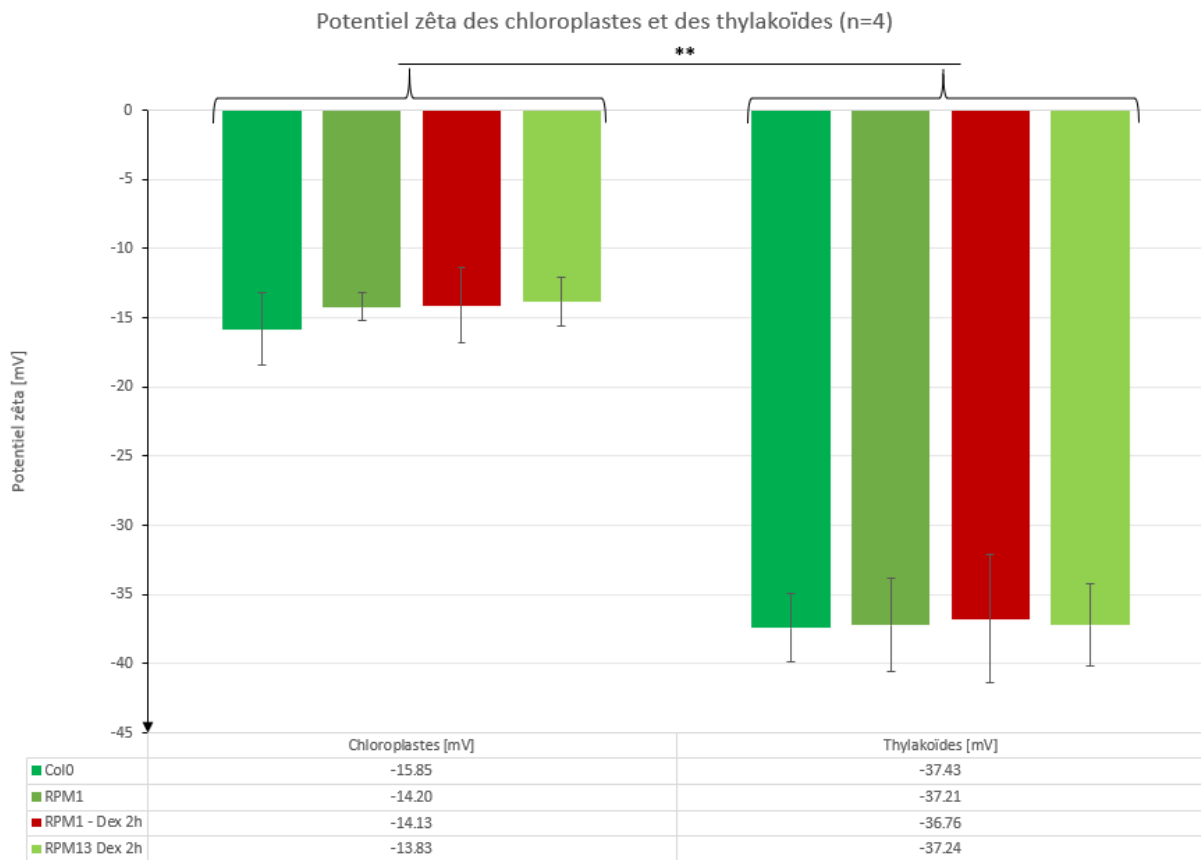


Figure 27. Comparaison du potentiel zêta des chloroplastes et des thylakoïdes des témoins négatifs (en vert) et de la plante stressée (en rouge). Les résultats sont présentés en moyenne \pm écart-type pour chaque modalité. Les tests ont été répétés quatre fois par modalité. Des tests T de Student deux par deux ont permis d'établir la significativité ou non des différences entre moyennes.

En ce qui concerne les chloroplastes, les résultats ne montrent aucune différence significative de potentiel zêta entre la plante stressée et les témoins négatifs. Autrement dit, le stress n'a pas d'effet sur le potentiel zêta et donc sur la charge de surface des chloroplastes. Pour ce qui est des thylakoïdes, l'observation est la même, aucune différence significative du potentiel zêta n'a été mise en évidence entre les 4 modalités. Les arabidopsides étant non chargés, ce ne sont pas eux qui auraient pu modifier directement ce potentiel.

Dès lors, la différence de fluidité observée avec la sonde DPH entre les membranes thylakoidales de plantes ayant accumulé des arabidopsides par rapport aux témoins négatifs n'est pas due aux lipides chargés situés dans ces membranes thylakoidales et pourrait être causée par l'oxydation des galactolipides membranaires en arabidopsides en conditions de stress.

Par contre, une différence hautement significative (**) entre le potentiel zêta des chloroplastes et celui des thylakoïdes a été démontrée. Ceci s'explique notamment par le fait que leurs teneurs en sulfoquinovosyldiacylglycérol, en phosphatidylglycérol et en phosphatidylcholine, tous les trois chargés négativement, diffèrent.

4. Quantification des arabidopsides contenus dans les chloroplastes

Etant donné qu'aucune différence morphologique et d'activité photosynthétique n'a été mise en évidence entre les chloroplastes issus de plantes ayant accumulé ou non des arabidopsides, il a été décidé de confirmer la présence de plus grandes quantités d'arabidopsides dans les chloroplastes issus de plantes stressées, par rapport aux témoins négatifs. Les arabidopsides contenus dans ces chloroplastes ont donc été extraits et quantifiés, pour les 4 modalités (Figure 28.).

Une fois de plus, les résultats montrent que les teneurs en arabidopside D sont les plus élevées, en accord avec le timing choisi après pulvérisation à la dexaméthasone. Les arabidopsides E et G n'ont pu être détectés dans aucun échantillon, même dans les chloroplastes issus de plantes stressées.

Etonnamment, les teneurs en arabidopsides A et B du « Col0 » ainsi que les teneurs en arabidopside A du « RPM13 avec Dex » sont plus élevées que les teneurs correspondants du « RPM1 avec Dex ». L'augmentation de la teneur en arabidopside D entre la plante stressée et les témoins négatifs est également plus faible que celle mise en évidence sur les analyses de feuilles. Ces résultats diffèrent grandement de ceux observés pour la quantification des arabidopsides dans les feuilles d'*A. thaliana*. Il est possible que ces résultats expliquent les faibles différences observées lors des différentes analyses ayant été réalisées sur les chloroplastes.

Néanmoins, le dosage des arabidopsides dans les échantillons de chloroplastes a été réalisé sur de très faibles quantités de chloroplastes qui avaient été congelés suite aux différentes analyses réalisées précédemment. En effet, la masse de lipides totaux extraits après séparation sur colonne SPE était de l'ordre du mg. Il est donc possible que cela été la cause d'imprécisions qui expliqueraient les faibles différences observées entre les plantes stressées et les témoins négatifs. Cela semble également cohérent avec l'absence d'arabidopside E dans les échantillons analysés, alors que cette molécule était présente en grande quantités dans les dosages d'arabidopsides réalisés sur les feuilles stressées (Figure 19.). De plus, les chloroplastes étant suspendus dans un tampon aqueux contenant de nombreuses molécules, l'extraction liquide-liquide a été compliquée par l'apparition d'une émulsion. Il est donc probable que ces teneurs soient biaisées. Dès lors, il serait intéressant de répéter ces analyses sur de plus grandes quantités de chloroplastes afin de confirmer que les chloroplastes isolés à partir de plantes stressées contenaient bien de plus grandes quantités d'arabidopsides dans leurs membranes que les témoins négatifs.

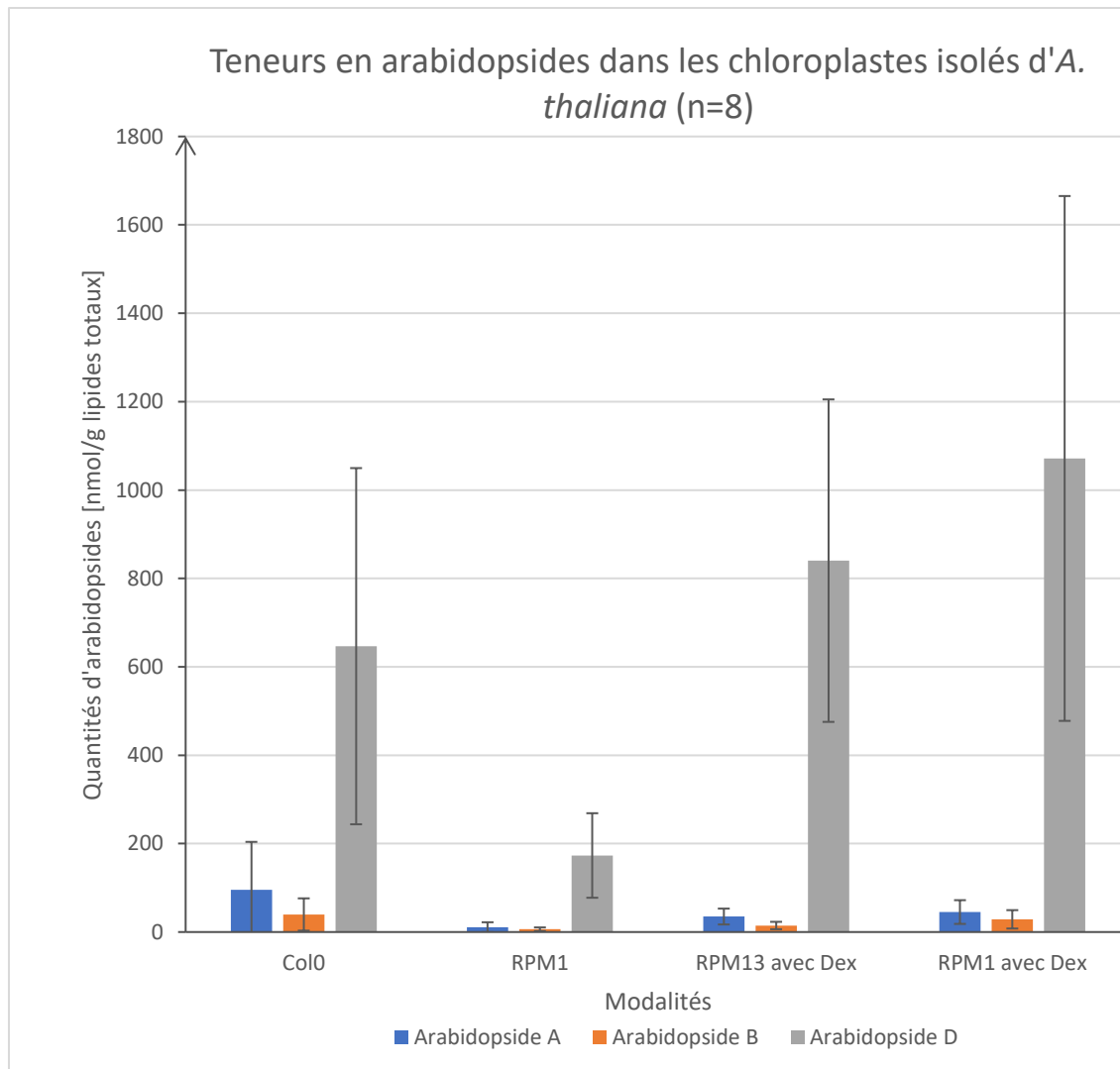


Figure 28. Teneurs en arabidopsides A, B et D des chloroplastes, isolés et analysés, pour les 4 modalités.

IV. Localisation sub-cellulaire des arabidopsides

Afin de localiser précisément les arabidopsides produits suite au stress dans les chloroplastes, des chloroplastes ont été isolés à partir de plantes stressées (condition RPM1 avec Dex) puis fractionnés. Les différentes fractions (enveloppe, stroma, thylakoïdes avec et sans plastoglobules, plastoglobules) ont ensuite été soumises à l'extraction et à la quantification d'arabidopsides tels que réalisés sur les feuilles d'*A. thaliana*. Les teneurs en arabidopsides de chaque fraction (n=2) sont reprises dans le tableau ci-dessous (Tableau 5.).

Tableau 5. Localisation et quantification par HPLC-MS des arabidopsides A, B, D, E et G. Légende : I, première répétition ; II, deuxième répétition ; ND : « Non détecté ».

| Fractions | Arabidopside A [nmol/g lipides totaux] | |
|---------------------------------|--|---------------|
| | I | II |
| Stroma | ND | ND |
| Enveloppe | ND | ND |
| Thylakoïdes avec plastoglobules | ND | 11.50 |
| Plastoglobules | ND | ND |
| Thylakoïdes sans plastoglobules | 42.53 | 6.05 |
| | Arabidopside B [nmol/g lipides totaux] | |
| | I | II |
| Stroma | ND | 2.79 |
| Enveloppe | ND | ND |
| Thylakoïdes avec plastoglobules | ND | 7.01 |
| Plastoglobules | ND | ND |
| Thylakoïdes sans plastoglobules | 79.40 | 30.36 |
| | Arabidopside D [nmol/g lipides totaux] | |
| | I | II |
| Stroma | 14.83 | 40.56 |
| Enveloppe | ND | ND |
| Thylakoïdes avec plastoglobules | 10.25 | 54.92 |
| Plastoglobules | ND | ND |
| Thylakoïdes sans plastoglobules | 1398.39 | 140.41 |
| | Arabidopside E [nmol/g lipides totaux] | |
| | I | II |
| Stroma | ND | ND |
| Enveloppe | ND | ND |
| Thylakoïdes avec plastoglobules | ND | 18.01 |
| Plastoglobules | ND | ND |
| Thylakoïdes sans plastoglobules | 535.26 | 61.63 |
| | Arabidopside G [nmol/g lipides totaux] | |
| | I | II |
| Stroma | ND | ND |
| Enveloppe | ND | ND |
| Thylakoïdes avec plastoglobules | ND | 41.73 |
| Plastoglobules | ND | ND |
| Thylakoïdes sans plastoglobules | 145.53 | 144.44 |

Les résultats montrent que les 5 arabidopsides ont été retrouvés en grandes quantités dans les fractions de thylakoïdes, que ce soit avec ou sans plastoglobules, en accord avec la littérature (Böttcher et al., 2007; Hansen et al., 2019). Aucun arabidopside n'a été retrouvé ni l'enveloppe externe des chloroplastes, ni dans les plastoglobules.

Un article précédent avait mis en évidence la présence de faibles quantités d'OPDA estérifié dans les membranes externes des chloroplastes (Böttcher et al., 2007). Cette différence pourrait soit être causée par une contamination de la fraction membrane externe avec la fraction thylakoïdes dans l'étude réalisée précédemment ; soit par une quantité de matériel végétal utilisé trop faible dans le présent travail. En effet, et par manque de matière végétale, les quantités de MF utilisées n'étaient que d'environ 310 g (répétition I) et 265 g (répétition II), par rapport aux 400-500 g de MF utilisés dans le protocole de

(Bouchnak et al., 2018). Cette quantité moindre de matière végétale en amont pourrait aussi expliquer le fait que l'on ait pas retrouvé d'arabidopsides dans les plastoglobules. En effet, de nombreuses étapes ont été nécessaires pour isoler les fractions obtenues et, en considérant une perte de matière d'étape en étape, il se peut que la quantité de plastoglobules récupérée n'ait pas été suffisante pour pouvoir détecter et quantifier les arabidopsides qu'ils contiennent potentiellement.

Etonnamment, les arabidopsides B et D ont été détectés dans le stroma des chloroplastes. Aucun article à ce jour ne témoigne de leur présence dans le stroma. Dès lors, il se pourrait que ces arabidopsides soient capables de se déplacer et donc d'induire un signal ou d'avoir un rôle direct. Pour s'en assurer, la pureté de toutes les fractions obtenues doit être vérifiée à l'aide d'un Western Blot afin d'exclure toute contamination entre celles-ci. Cette confirmation n'a pas pu être réalisée dans le cadre de ce travail.

Conclusion et perspectives

Lors de ce travail de fin d'études, un protocole d'isolation et de fractionnement de chloroplastes d'*A. thaliana* a été mis au point. Ensuite, un stress d'origine biotique a été induit, et la formation d'arabidopsides subséquente a été confirmée par dosage en HPLC-MS. L'impact de la formation de ces arabidopsides sur les chloroplastes et les thylakoïdes d'*A. thaliana* en conditions de stress a été déterminé.

Premièrement, la taille, la morphologie, la fluorescence des chlorophylles et le potentiel zêta de chloroplastes stressés et non stressés ont été comparés, sans différence significative observée. Cette comparaison a aussi été menée sur la fluidité membranaire et le potentiel zêta de thylakoïdes stressés et non stressés. Pour le potentiel zêta, les différences observées étaient non significatives. Cependant, il a été montré que la fluidité membranaire des thylakoïdes augmente de façon significative, suite au stress. Il serait intéressant de compléter et d'approfondir ces comparaisons. Une première approche pourrait être l'utilisation de microscopes plus puissants, permettant de discerner les changements survenus dans les chloroplastes suite au stress, voir même de réaliser un « timelapse » afin d'observer ces changements de façon dynamique. Il serait également intéressant de mesurer de façon précise la taille absolue de populations de chloroplastes et des thylakoïdes, et non d'une taille relative comme en cytométrie de flux, à l'aide d'un granulomètre par exemple. Enfin, des sondes pourraient être incorporées dans l'enveloppe des chloroplastes afin de mesurer et comparer la fluidité membranaire de ces dernières soumises ou non à un stress.

Deuxièmement, la localisation sub-cellulaire des arabidopsides au sein de chloroplastes d'individus stressés a été déterminée. Cette manipulation a mis en lumière que les arabidopsides étaient surtout localisés dans les thylakoïdes, en accord avec la littérature (Böttcher et al., 2007; Hansen et al., 2019). Aucun arabidopside n'a été détecté dans l'enveloppe ni dans les plastoglobules. Par contre, les arabidopsides B et D ont été détectés et quantifiés dans le stroma, ce qui n'avait jamais été mis en évidence dans la littérature. Avant de pouvoir conclure à une découverte, il est nécessaire de vérifier la pureté des fractions isolées, à l'aide d'un « western-blotting » par exemple, afin de s'assurer qu'il n'y a pas eu de contaminations entre les différentes fractions isolées. La présence des arabidopsides dans le stroma semble indiquer que ces molécules pourraient se retrouver ailleurs que dans les membranes au sein desquelles elles sont formées. Afin d'étendre la localisation sub-cellulaire des arabidopsides, serait donc intéressant de les chercher ailleurs dans la cellule, dans le réticulum endoplasmique ou dans la membrane plasmique par exemple.

En parallèle à tout ceci, il faudrait investiguer l'utilisation de temps d'induction à la dexaméthasone différents, afin d'étudier l'impact qu'aurait par exemple une formation plus forte d'arabidopsides E et G sur les propriétés des chloroplastes et thylakoïdes isolés et sur la localisation de ces derniers dans le chloroplaste.

Enfin, il est possible que les arabidopsides servent de forme de stockage pour les (dn)OPDA, des précurseurs de l'acide jasmonique. Ceux-ci pourraient alors être rapidement mobilisés par la plante en cas d'attaque par un pathogène et soit directement moduler l'expression de gènes, soit servir à la production d'acide jasmonique (Kourtchenko et al., 2007; Ibrahim, 2011; Dave et al., 2012; Genva et al., 2019; Griffiths, 2020; Song et al., 2021). Dès lors, la quantification de ces oxylipines libres et des arabidopsides, suite à des infections de pathogènes, permettrait de confirmer cette hypothèse et par exemple d'observer si les pics d'arabidopsides diminuent en faveur de l'augmentation des pics d'oxylipines libres, suite à une réinfection par un pathogène.

Références

- Ahuja I., Kissen R. & Bones A.M., 2012. Phytoalexins in defense against pathogens. *Trends Plant Sci.*
- Andersson M.X. & Dörmann P., 2009. Chloroplast membrane lipid biosynthesis and transport. *Plant Cell Monogr.* **13**, 125–158
- Andersson M.X., Hamberg M., Kourtchenko O., Brunnström Å., McPhail K.L., Gerwick W.H., Göbel C., Feussner I. & Ellerström M., 2006a. Oxylin Profiling of the Hypersensitive Response in *Arabidopsis thaliana*. *J. Biol. Chem.* **281**(42), 31528–31537
- Andersson M.X., Hamberg M., Kourtchenko O., Brunnström Å., McPhail K.L., Gerwick W.H., Göbel C., Feussner I. & Ellerström M., 2006b. Oxylin Profiling of the Hypersensitive Response in *Arabidopsis thaliana*: FORMATION OF A NOVEL OXO-PHYTODIENOIC ACID-CONTAINING GALACTOLIPID, ARABIDOPSISIDE E. *J. Biol. Chem.* **281**(42), 31528–31537
- Backer R., Naidoo S. & van den Berg N., 2019. The NONEXPRESSOR OF PATHOGENESIS-RELATED GENES 1 (NPR1) and related family: Mechanistic insights in plant disease resistance. *Front. Plant Sci.*
- Balint-Kurti P., 2019. The plant hypersensitive response: concepts, control and consequences. *Mol. Plant Pathol.*
- Barber J., Ford R.C., Mitchell R.A.C. & Millner P.A., 1984. Chloroplast thylakoid membrane fluidity and its sensitivity to temperature. *Planta* **161**(4), 375–380,
- Bhattacharya O., Ortiz I. & Walling L.L., 2020. Methodology: an optimized, high-yield tomato leaf chloroplast isolation and stroma extraction protocol for proteomics analyses and identification of chloroplast co-localizing proteins. *Plant Methods* **16**(1), 1–21
- Birkett M.A., Campbell C.A.M., Chamberlain K., Guerrieri E., Hick A.J., Martin J.L., Matthes M., Napier J.A., Pettersson J., Pickett J.A., Poppy G.M., Pow E.M., Pye B.J., Smart L.E., Wadhams G.H., Wadhams L.J. & Woodcock C.M., 2000. New roles for cis-jasmone as an insect semiochemical and in plant defense. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **97**(16), 9329–9334,
- Block M.A. & Albrieux C., 2018. Purification of chloroplasts and chloroplast subfractions: Envelope, thylakoids, and stroma—From Spinach, Pea, and *arabidopsis Thaliana*. In: *Methods in Molecular Biology*. Humana Press Inc., 123–135.
- Block M.A., Dorne A.J., Joyard J. & Douce R., 1983. Preparation and characterization of membrane fractions enriched in outer and inner envelope membranes from spinach chloroplasts. II. Biochemical characterization. *J. Biol. Chem.* **258**(21), 13281–13286,
- Böttcher C. & Weiler E.W., 2007. cyclo-Oxylin-galactolipids in plants: occurrence and dynamics. *Planta* 2007 2263 **226**(3), 629–637,
- Bouchnak I., Moyet L., Salvi D., Kuntz M. & Rolland N., 2018. Preparation of Chloroplast Sub-compartments from *Arabidopsis* for the Analysis of Protein Localization by Immunoblotting or Proteomics. *J. Vis. Exp.* (140)
- Campos M.L., Kang J.-H. & Howe G.A., 2014. Jasmonate-Triggered Plant Immunity. *J. Chem. Ecol.* **40**(7), 657–675
- Castillo-Hair S.M., Sexton J.T., Landry B.P., Olson E.J., Igoshin O.A. & Tabor J.J., 2016. FlowCal: A User-Friendly, Open Source Software Tool for Automatically Converting Flow Cytometry Data from Arbitrary to Calibrated Units. *ACS Synth. Biol.* **5**(7), 774–780,
- Chini A., Monte I., Zamarreño A.M., Hamberg M., Lassueur S., Reymond P., Weiss S., Stintzi A., Schaller A., Porzel A., García-Mina J.M. & Solano R., 2018. An OPR3-independent pathway uses 4,5-didehydrojasmonate for jasmonate synthesis. *Nat. Chem. Biol.* **14**(2), 171–178,

- Chu C.C. & Li H.M., 2011. Determining the location of an arabidopsis chloroplast protein using in vitro import followed by fractionation and alkaline extraction. *Methods Mol. Biol.* **774**, 339–350,
- Corina Vlot A., Dempsey D.A. & Klessig D.F., 2009. Salicylic acid, a multifaceted hormone to combat disease. *Annu. Rev. Phytopathol.* **47**, 177–206
- Dave A. & Graham I.A., 2012. Oxylin signaling: A distinct role for the jasmonic acid precursor cis-(+)-12-oxo-phytodienoic acid (cis-OPDA). *Front. Plant Sci.* **3**(MAR), 42,
- Deleu M., Crowet J.-M., Nasir M.N. & Lins L., 2014. Complementary biophysical tools to investigate lipid specificity in the interaction between bioactive molecules and the plasma membrane.
- Dörmann P. & Benning C., 2002. Galactolipids rule in seed plants. *Trends Plant Sci.* **7**(3), 112–118,
- Douce R., Block M.A., Dorne A.J. & Joyard J., 1984. The plastid envelope membranes: their structure, composition, and role in chloroplast biogenesis. *Subcell. Biochem.*
- Farooq M., Niazi A., Akhtar J., Saifullah N., Farooq M., Sour Z., Karimi N. & Rengel Z., 2019. Acquiring control: The evolution of ROS-Induced oxidative stress and redox signaling pathways in plant stress responses. *Plant Physiol. Biochem. PPB* **141**, 353–369,
- Figuerola-Macías J.P., García Y.C., Núñez M., Díaz K., Olea A.F. & Espinoza L., 2021. Plant growth-defense trade-offs: Molecular processes leading to physiological changes. *Int. J. Mol. Sci.*
- Flores-Pérez Ú. & Jarvis P., 2017. Isolation and suborganellar fractionation of arabidopsis chloroplasts. *In: Methods in Molecular Biology*. Humana Press Inc., 45–60.
- Ford R.C., 1983. The role of lipid fluidity in the function of the thylakoid membrane.
- Genva M., Andersson M.X. & Fauconnier M.L., 2020. Simple liquid chromatography-electrospray ionization ion trap mass spectrometry method for the quantification of galacto-oxylin arabidopsides in plant samples. *Sci. Rep.* **10**(1),
- Genva M., Obounou Akong F., Andersson M.X., Deleu M., Lins L. & Fauconnier M.L., 2019. New insights into the biosynthesis of esterified oxylin and their involvement in plant defense and developmental mechanisms. *Phytochem. Rev.* **18**(1), 343–358,
- Ghorbel M., Brini F., Sharma A. & Landi M., 2021. Role of jasmonic acid in plants: the molecular point of view. *Plant Cell Rep.*
- Glazebrook J., 2005. Contrasting Mechanisms of Defense Against Biotrophic and Necrotrophic Pathogens. *Annu. Rev. Phytopathol.* **43**(1), 205–227,
- Göbel C. & Feussner I., 2009. Methods for the analysis of oxylin in plants. *Phytochemistry* **70**(13–14), 1485–1503
- Griffiths G., 2015. Biosynthesis and analysis of plant oxylin. *Free Radic. Res.*
- Griffiths G., 2020. Jasmonates: Biosynthesis, perception and signal transduction. *Essays Biochem.*
- Guidi L., Tattini M. & Landi M., 2017. How Does Chloroplast Protect Chlorophyll Against Excessive Light? *Chlorophyll*
- Gupta A., Bhardwaj M. & Tran L.S.P., 2020. Jasmonic acid at the crossroads of plant immunity and pseudomonas syringae virulence. *Int. J. Mol. Sci.* **21**(20), 1–19,
- Hammerschmidt R., 2009. Chapter 5 Systemic Acquired Resistance. *In: Advances in Botanical Research*. 173–222.
- Han G.Z., 2019. Origin and evolution of the plant immune system. *New Phytol.* **222**(1), 70–83,
- Hansen R.L., Guo H., Yin Y. & Lee Y.J., 2019. FERONIA mutation induces high levels of chloroplast-localized Arabidopsides which are involved in root growth. *Plant J.* **97**(2), 341–351,

- Hao D., Sun X., Ma B., Zhang J.-S. & Guo H., 2017. Ethylene. *In: Hormone Metabolism and Signaling in Plants*. Elsevier, 203–241.
- Hasanuzzaman M., Fotopoulos V., Nahar K. & Fujita M., 2019. *Reactive Oxygen, Nitrogen and Sulfur Species in Plants*, Reactive Oxygen, Nitrogen and Sulfur Species in Plants: Production, Metabolism, Signaling and Defense Mechanisms. Hasanuzzaman, M., Fotopoulos, V., Nahar, K., Fujita, M. eds., Wiley, 1–945.
- Ibrahim A., 2011. The alphabet of galactolipids in Arabidopsis thaliana. *Front. Plant Sci.* **2**(DEC), 95,
- Jang G., Yoon Y. & Choi Y. Do, 2020. Crosstalk with jasmonic acid integrates multiple responses in plant development. *Int. J. Mol. Sci.*
- Jarvis P., 2011. *Chloroplast Research in Arabidopsis, Volume II*, Methods in Molecular Biology. Jarvis, R.P. ed., Totowa, NJ: Humana Press.
- Jensen P.E. & Leister D., 2014. Chloroplast evolution, structure and functions. *F1000Prime Rep.*
- Jin J.B., Cai B. & Zhou J.-M., 2017. Salicylic acid. *In: Hormone Metabolism and Signaling in Plants*. Elsevier, 273–289.
- Jones J.D.G. & Dangl J.L., 2006. The plant immune system. *Nature* **444**(7117), 323–329,
- Kirchhoff H., 2019. Chloroplast ultrastructure in plants. *New Phytol.*
- Koo A.J., 2018. Metabolism of the plant hormone jasmonate: a sentinel for tissue damage and master regulator of stress response. *Phytochem. Rev.* **17**(1), 51–80,
- Kourtchenko O., Andersson M.X., Hamberg M., Brunnström Å., Göbel C., McPhail K.L., Gerwick W.H., Feussner I. & Ellerström M., 2007. Oxo-phytodienoic acid-containing galactolipids in arabidopsis: Jasmonate signaling dependence. *Plant Physiol.* **145**(4), 1658–1669,
- Kraepiel Y. & Barny M.-A., 2016. Gram-negative phytopathogenic bacteria, all hemibiotrophs after all? *Mol. Plant Pathol.* **17**(3), 313–316
- Laxalt A.M. & Munnik T., 2002. Phospholipid signalling in plant defence. *Curr. Opin. Plant Biol.* **5**(4), 332–338
- Lebecque S., 2019. Etude des interactions de molécules phytotoxiques avec des modèles membranaires inspirés de la membrane plasmique végétale.
- Lee H.A., Lee H.Y., Seo E., Lee J., Kim S.B., Oh S., Choi E., Choi E., Lee S.E. & Choi D., 2017. Current understandings of plant nonhost resistance. *Mol. Plant-Microbe Interact.*
- Lentz B.R., 2018. *Membrane “Fluidity” From Fluorescence Anisotropy Measurements*, Spectroscopic Membrane Probes, CRC Press, 13–37.
- Li J., Liu L.N., Meng Q., Fan H. & Sui N., 2020. The roles of chloroplast membrane lipids in abiotic stress responses. *Plant Signal. Behav.* **15**(11)
- Li P., Lu Y.-J., Chen H. & Day B., 2020. The Lifecycle of the Plant Immune System. *CRC. Crit. Rev. Plant Sci.* **39**(1), 72–100
- Lin Z.F., Liu N., Lin G.Z. & Peng C.L., 2011. Factors altering the membrane fluidity of spinach thylakoid as determined by fluorescence polarization. *Acta Physiol. Plant.* **33**(3), 1019–1024,
- Littlejohn G.R., Breen S., Smirnoff N. & Grant M., 2020. Chloroplast immunity illuminated. *New Phytol.*
- Liu H. & Timko M.P., 2021. Jasmonic acid signaling and molecular crosstalk with other phytohormones. *Int. J. Mol. Sci.*
- Lu Y., Liu L.N., Roston R.L., Soll J. & Gao H., 2020. Editorial: Structure and Function of Chloroplasts

- Mackey D., Holt B.F., Wiig A. & Dangl J.L., 2002a. RIN4 Interacts with *Pseudomonas syringae* Type III Effector Molecules and Is Required for RPM1-Mediated Resistance in *Arabidopsis*. *Cell* **108**(6), 743–754
- Mackey D., Holt B.F., Wiig A. & Dangl J.L., 2002b. RIN4 interacts with *Pseudomonas syringae* type III effector molecules and is required for RPM1-mediated resistance in *Arabidopsis*. *Cell* **108**(6), 743–754
- McCourt P., Kunst L., Browse J. & Somerville C.R., n.d. The Effects of Reduced Amounts of Lipid Unsaturation on Chloroplast Ultrastructure and Photosynthesis in a Mutant of *Arabidopsis*. *PLANT Physiol.* **84**(2), 353–360.
- Métraux J.P., Jackson R.W., Schnettler E. & Goldbach R.W., 2009. Chapter 2 Plant Pathogens as Suppressors of Host Defense. *In: Advances in Botanical Research*. 39–89.
- Mur L.A.J., Kenton P., Atzorn R., Miersch O. & Wasternack C., 2006. The outcomes of concentration-specific interactions between salicylate and jasmonate signaling include synergy, antagonism, and oxidative stress leading to cell death. *Plant Physiol.* **140**(1), 249–262,
- Nguyen H.T., To H.T.M., Lebrun M., Bellafiore S. & Champion A., 2019. Jasmonates—the master regulator of rice development, adaptation and defense. *Plants* **8**(9)
- Nilsson A.K., Fahlberg P., Ellerström M. & Andersson M.X., 2012. Oxo-phytodienoic acid (OPDA) is formed on fatty acids esterified to galactolipids after tissue disruption in *Arabidopsis thaliana*. *FEBS Lett.* **586**(16), 2483–2487
- Nishad R., Ahmed T., Rahman V.J. & Kareem A., 2020. Modulation of Plant Defense System in Response to Microbial Interactions. *Front. Microbiol.* **11**(July), 1–13,
- Nürnberg T. & Kemmerling B., 2009. Chapter 1 PAMP-Triggered Basal Immunity in Plants. *In: Advances in Botanical Research*. 1–38.
- Rascio N., 2013. Chloroplasts. *In: Encyclopedia of Biological Chemistry: Second Edition*. Elsevier Inc., 506–510.
- Reimer-Michalski E.M. & Conrath U., 2016. Innate immune memory in plants. *Semin. Immunol.* **28**(4), 319–327
- Rodriguez E., Azevedo R., Costa A., Serôdio J. & Santos C., 2012. Chloroplast functionality assessment by flow cytometry: Case study with pea plants under Paraquat stress. *Photosynth. 2012* **502** **50**(2), 197–205,
- Schellenberger R., Touchard M., Clément C., Baillieul F., Cordelier S., Crouzet J. & Dorey S., 2019. Apoplastic invasion patterns triggering plant immunity: plasma membrane sensing at the frontline. *Mol. Plant Pathol.*
- Song Y., Lwe Z.S.Z., Arachchige P., Bashanee D., Wickramasinghe V. & Welti R., 2021. Head-Group Acylation of Chloroplast Membrane Lipids.
- Spoel S.H. & Dong X., 2008. Making Sense of Hormone Crosstalk during Plant Immune Responses. *Cell Host Microbe*.
- Spoel S.H., Johnson J.S. & Dong X., 2007. Regulation of tradeoffs between plant defenses against pathogens with different lifestyles. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **104**(47), 18842–18847,
- Staehelin L.A. & van der Staay G.W.M., 1996. Structure, Composition, Functional Organization and Dynamic Properties of Thylakoid Membranes. Springer, Dordrecht, 11–30.
- Taiz L., Zeiger E., Moller I.M. & Murphy A., 2014. *Plant Physiology and Development*, Oxford

- University Press (OUP), 761.
- Upchurch R.G., 2008. Fatty acid unsaturation, mobilization, and regulation in the response of plants to stress. *Biotechnol. Lett.* 2008 306 **30**(6), 967–977,
- Vallad G.E. & Goodman R.M., 2004. Systemic acquired resistance and induced systemic resistance in conventional agriculture. *Crop Sci.* **44**(6), 1920–1934
- Van Wijk K.J. & Kessler F., 2017. Plastoglobuli: Plastid Microcompartments with Integrated Functions in Metabolism, Plastid Developmental Transitions, and Environmental Adaptation. *Annu. Rev. Plant Biol.*
- Vidhyasekaran P., 2014. PAMP Signaling in Plant Innate Immunity. 17–161.
- Vidhyasekaran P., 2015. *Plant Hormone Signaling Systems in Plant Innate Immunity Signaling and Communication in Plants*, 473.
- Vlot A.C., Sales J.H., Lenk M., Bauer K., Brambilla A., Sommer A., Chen Y., Wenig M. & Nayem S., 2021. Systemic propagation of immunity in plants. *New Phytol.* **229**(3), 1234–1250,
- Vu H.S., Roth M.R., Tamura P., Samarakoon T., Shiva S., Honey S., Lowe K., Schmelz E.A., Williams T.D. & Welti R., 2014. Head-group acylation of monogalactosyldiacylglycerol is a common stress response, and the acyl-galactose acyl composition varies with the plant species and applied stress. *Physiol. Plant.* **150**(4), 517–528,
- Vu H.S., Tamura P., Galeva N.A., Chaturvedi R., Roth M.R., Williams T.D., Wang X., Shah J. & Welti R., 2012. Direct infusion mass spectrometry of oxylipin-containing arabidopsis membrane lipids reveals varied patterns in different stress responses. *Plant Physiol.* **158**(1), 324–339,
- Walters D.R., 2010. *Plant Defense*, Plant Defense: Warding off attack by pathogens, herbivores and parasitic plants, Oxford, UK: Wiley-Blackwell, 1–236.
- Wasternack C. & Feussner I., 2018. The Oxylipin Pathways: Biochemistry and Function. *Annu. Rev. Plant Biol.* **69**, 363–386,
- Wasternack C. & Hause B., 2013. Jasmonates: Biosynthesis, perception, signal transduction and action in plant stress response, growth and development. An update to the 2007 review in *Annals of Botany*. *Ann. Bot.*
- Wasternack C. & Strnad M., 2016. Jasmonate signaling in plant stress responses and development – active and inactive compounds. *N. Biotechnol.*
- Wasternack C. & Strnad M., 2018. Jasmonates: News on occurrence, biosynthesis, metabolism and action of an ancient group of signaling compounds. *Int. J. Mol. Sci.* **19**(9), 1–26,
- Waszczak C., Carmody M. & Kangasjärvi J., 2018. Reactive Oxygen Species in Plant Signaling. *Annu. Rev. Plant Biol.* **69**(1), 209–236,
- Yamamoto Y., Hori H., Kai S., Ishikawa T., Ohnishi A., Tsumura N. & Morita N., 2013. Quality control of photosystem II: Reversible and irreversible protein aggregation decides the fate of photosystem II under excessive illumination. *Front. Plant Sci.* **4**(OCT)
- Yamamoto Y., Nishi Y., Yamasaki H., Uchida S. & Ohira S., 2004. Assay of photoinhibition of photosystem II and protease activity. *Methods Mol. Biol.* **274**, 217–227
- Yang F., Xiao K., Pan H. & Liu J., 2021. Chloroplast: The Emerging Battlefield in Plant–Microbe Interactions. *Front. Plant Sci.* **12**, 218
- Yang Y.-X., Ahammed G., Wu C., Fan S. & Zhou Y.-H., 2015. Crosstalk among Jasmonate, Salicylate and Ethylene Signaling Pathways in Plant Disease and Immune Responses. *Curr. Protein Pept. Sci.* **16**(5), 450–461

- Yu C.W., Lin Y.T. & Li H. min, 2020. Increased ratio of galactolipid MGDG : DGDG induces jasmonic acid overproduction and changes chloroplast shape. *New Phytol.* **228**(4), 1327–1335
- Yu X., Feng B., He P. & Shan L., 2017. From Chaos to Harmony: Responses and Signaling upon Microbial Pattern Recognition. *Annu. Rev. Phytopathol.* **55**(1), 109–137
- Yuan P., Jauregui E., Du L., Tanaka K. & Poovaiah B., 2017. Calcium signatures and signaling events orchestrate plant–microbe interactions. *Curr. Opin. Plant Biol.* **38**, 173–183
- Zechmann B., 2019. Ultrastructure of plastids serves as reliable abiotic and biotic stress marker. *PLoS One* **14**(4), e0214811, DOI:10.1371/journal.pone.0214811.
- Zhai Q., Yan C., Li L., Xie D. & Li C., 2017. Jasmonates. *In: Hormone Metabolism and Signaling in Plants*. Elsevier, 243–272.

Annexes

1. Annexes liées au matériel et méthodes

Annexe 1. Liste des réactifs avec abréviation, fabricant et pureté.

| Nom complet | Abréviation | Fabricant | Pureté |
|---|--------------------------------|----------------|---------|
| 1,6-diphényl-1,3,5-hexatriène | DPH | Sigma | 98% |
| 2,6-di-ter-butyl-4-méthylphénol | BHT | Sigma | ≥ 99% |
| Acétone | | ChemLab | >99.8% |
| Acétonitrile | | VWR | ≥ 99.9% |
| Acide 2-(N-morpholino)éthanosulfonique | MES | Sigma | ≥ 99% |
| Acide 3-(N-morpholino)propanesulfonique | MOPS | Fisher | ≥ 97% |
| Acide 4-(2-hydroxyéthyl)-pipérazine éthane sulfonique | HEPES | Sigma | ≥ 99.5% |
| Acide caproïque | | ACROS Organics | 98% |
| Acide egtazique | EGTA | VWR | ≥ 99.5% |
| Acide éthylènediaminetétraacétique | EDTA | Sigma | ≥ 99% |
| Acide formique | | Merck | ≥ 99% |
| Benzamidine hydrochloride hydrate | BHH | Sigma | ≥ 99% |
| Chloroforme | | ChemLab | > 99.8% |
| Chlorure de magnésium | MgCl ₂ | Sigma | anhydre |
| Chlorure de sodium | NaCl | Fisher | 99.70% |
| Dexaméthasone | Dex | ACROS Organics | 96% |
| Dithiothréitol | DTT | Sigma | > 99.5% |
| D-Sorbitol | | Alfa Aesar | 98% |
| Fluorure de phénylméthylsulfonyl | PMSF | BioChemica | ≥ 99.0% |
| Formate d'ammonium | | Sigma | ≥ 99.0% |
| Glutathion | GSH | ACROS Organics | ≥ 98.0% |
| Hydroxyde de potassium | KOH | Fisher | 88.14% |
| Hydroxyde de sodium | NaOH | Merck | ≥ 99.0% |
| Isopropanol | | ChemLab | > 99.8% |
| Méthanol | | ChemLab | > 99.9% |
| N-(2-Hydroxy-1,1-bis(hydroxyméthyl)éthyl)glycine | Tricine | ACROS Organics | > 99% |
| N,N,N-triméthyl-4-(6-phényl-1,3,5-hexatrièn-1-yl)phénylammonium | TMA-DPH | Sigma | ≥ 95% |
| Percoll® | | GE Healthcare | |
| Saccharose | | Sigma | ≥ 99.0% |
| Sérum albumine bovine | BSA | Sigma | ≥ 98% |
| Sulfate de magnésium | MgSO ₄ | Carlo Erba | ≥ 99.5% |
| Sulfate de potassium | K ₂ SO ₄ | Merck | ≥ 99.0% |
| Tétrahydrofurane | THF | Merck | ≥ 99.9% |

Annexe 2. Visualisation de l'effet du stress après 24h. A gauche, un mutant AvrRpm1/Col-0 24h après pulvérisation à la dexaméthasone. A droite, le même mutant sans pulvérisation à la dexaméthasone.

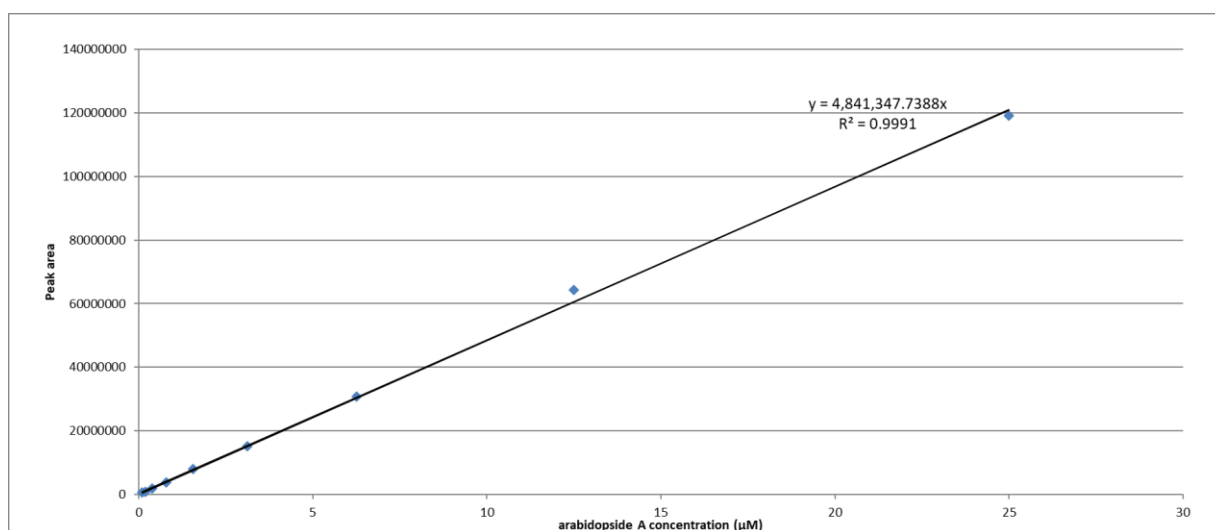


Annexe 3. Paramètres de l'ion trap optimisés pour l'analyse des arabidopsides A, B, D, E et G. D'après (Genva et al., 2020).

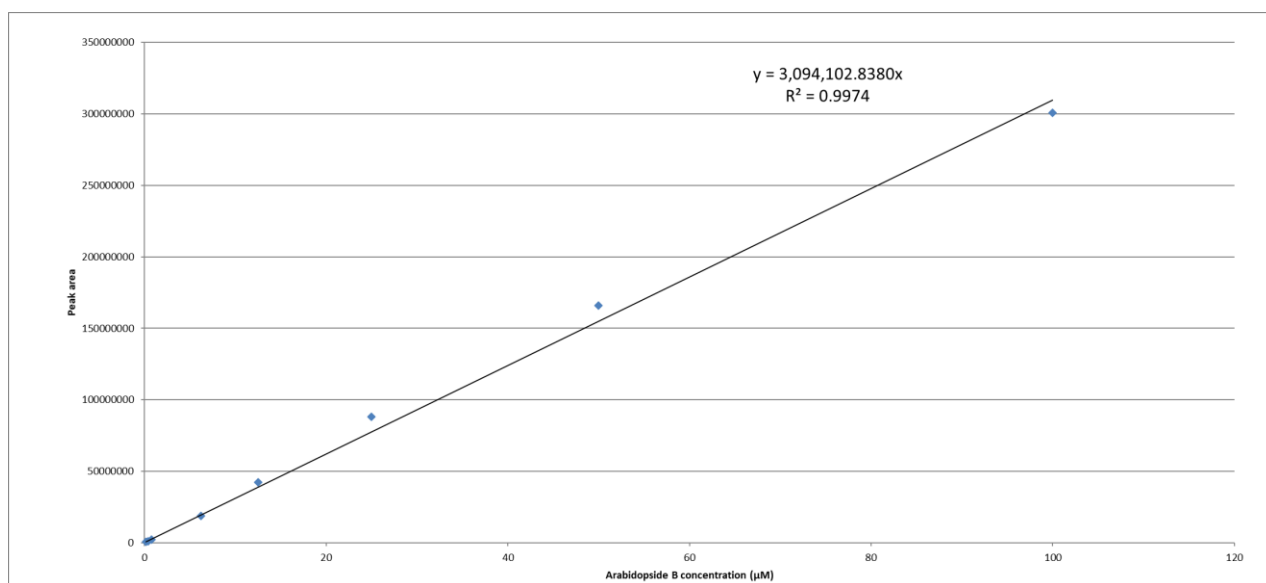
| | Arabidopsides A et B | Arabidopside D | Arabidopsides E et G |
|---------------------|----------------------|----------------|----------------------|
| Temperature [°C] | 250 | 300 | 300 |
| Skimmer [V] | 38.7 | 47 | 20.6 |
| Endplate offset [V] | -500 | -500 | -500 |
| Cap exit [V] | 150.6 | 300 | 300 |
| Oct 1 DC [V] | 12 | 9 | 10 |
| Oct 2 DC [V] | 2.23 | 2.75 | 2.79 |
| Lens 1 [V] | -5 | -3.7 | -5 |
| Lens 2 [V] | -60 | -54.3 | -72 |
| Oct RF [Vpp] | 200 | 300 | 300 |
| Trap drive | 75.6 | 90 | 92.8 |
| Smart target | 150000 | 200000 | 200000 |
| Scan [m/z] | 200 - 1100 | 200 - 1100 | 300 - 1250 |

2. Droites de calibrage des arabidopsides A, B et D et courbes de calibrage des arabidopsides E et G

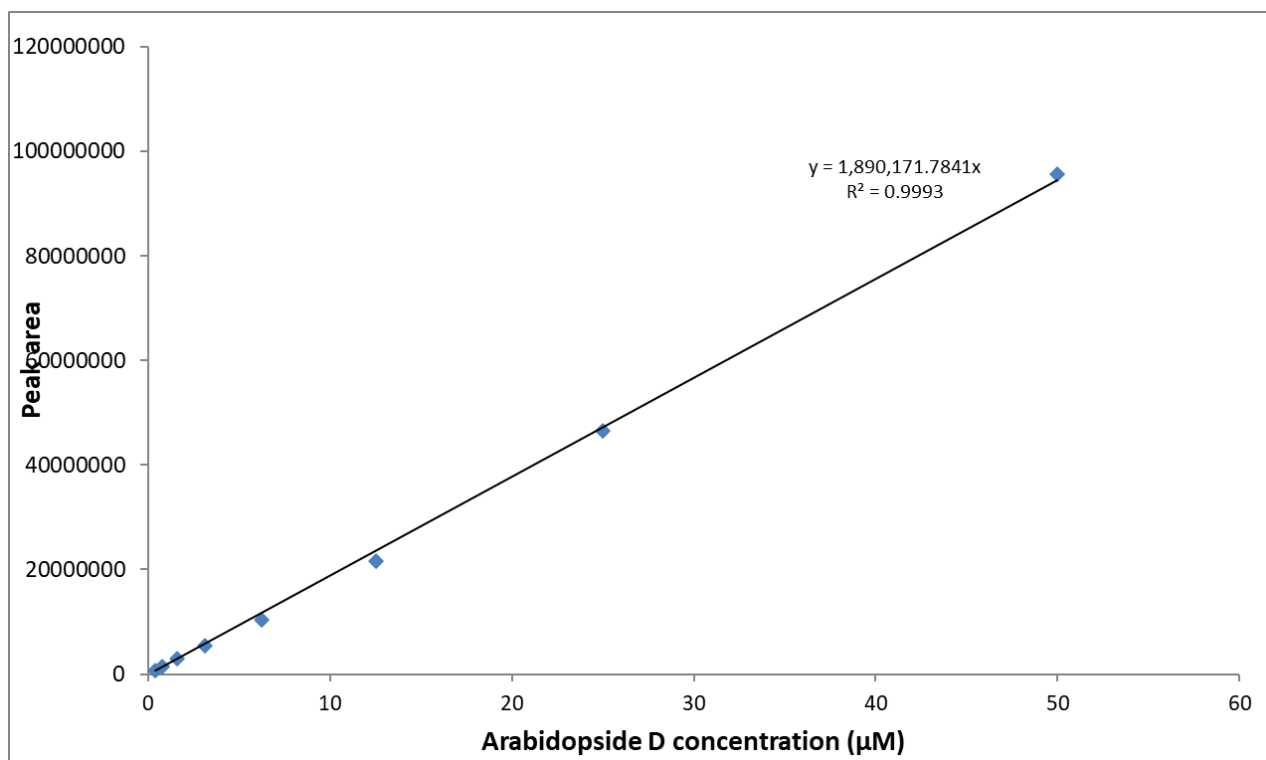
Annexe 4. Droite de calibrage de l'arabidopside A



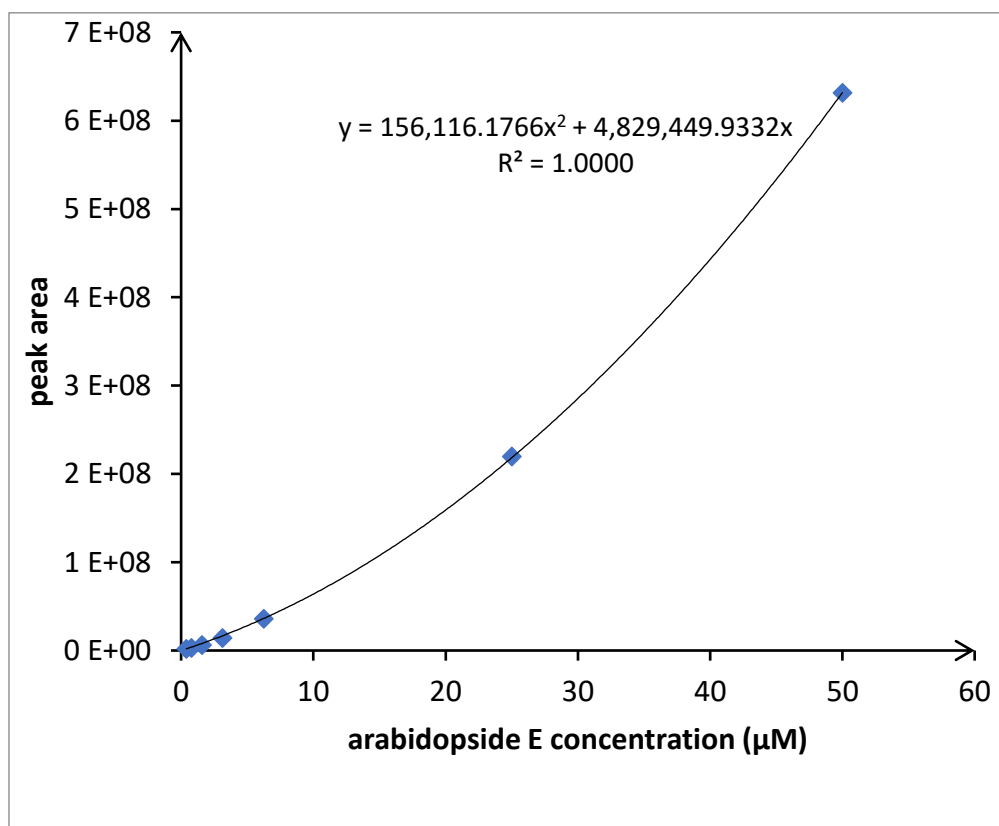
Annexe 5. Droite de calibrage de l'arabidopside B.



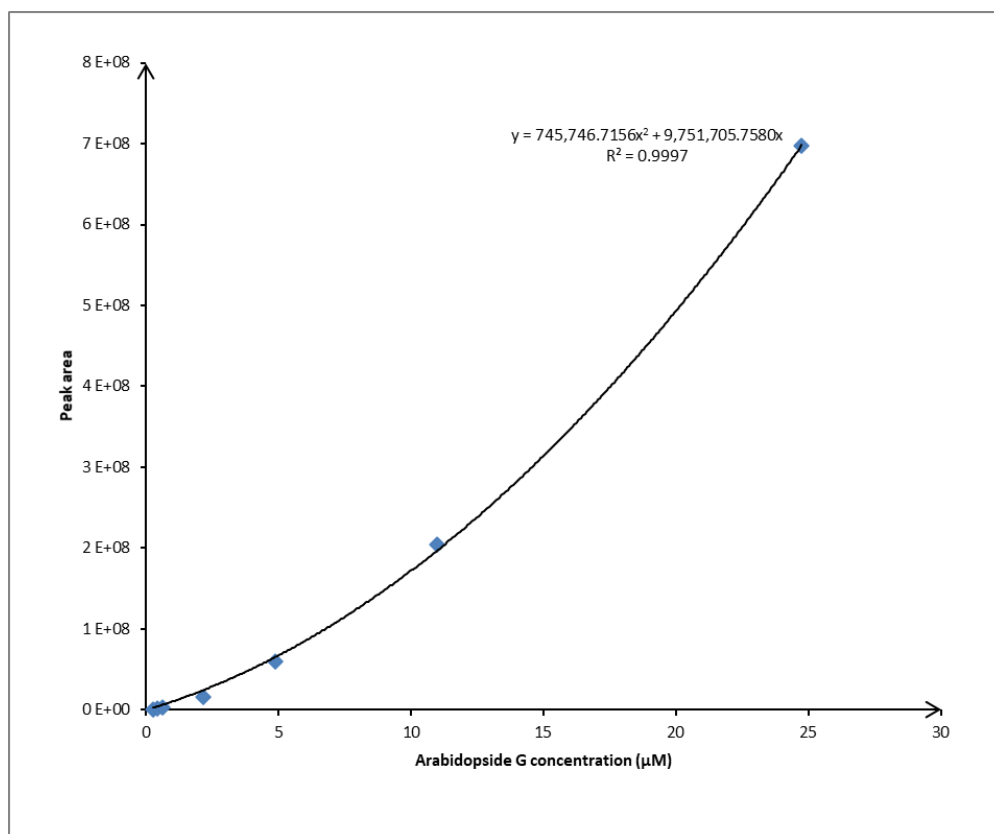
Annexe 6. Droite de calibration de l'arabidopside D.



Annexe 7. Courbe de calibration de l'arabidopside E



Annexe 8. Courbe de calibrage de l'arabidopside G



3. Résultats bruts

Annexe 9. Données brutes : Détermination du temps optimal suite à l'induction

| Temps [h] | | Intégration arabidopside A | Intégration arabidopside B | Intégration arabidopside D | Intégration arabidopside E | Intégration arabidopside G |
|---|-----|----------------------------|----------------------------|----------------------------|----------------------------|----------------------------|
| 0 | I | 718534 | 77958 | 2226520 | 1237169 | 290390 |
| | II | 1260115 | 166189 | 6420581 | 2318249 | 322090 |
| | III | | | | | |
| 1 | I | 1321008 | 332653 | 15651949 | 12982737 | 3744771 |
| | II | 1607579 | 411856 | 18413883 | 4002670 | 1105058 |
| | III | | | | | |
| 2 | I | 2854735 | 592133 | 34584231 | 22584013 | 6207926 |
| | II | 2028513 | 488476 | 22474305 | 9052700 | 2088902 |
| | III | 6143684 | 148615 | 49929384 | 6886113 | 2011049 |
| 3 | I | 743572 | 149256 | 7259971 | 26688517 | 654719 |
| | II | 971254 | 141334 | 4174546 | 7169471 | 970018 |
| | III | | | | | |
| 4 | I | | | | | |
| | II | 1715811 | 295977 | 17336347 | 11926881 | 1378200 |
| | III | 1240250 | 161478 | 11743840 | 1351442 | |
| 5 | I | 2082262 | 211735 | 10748642 | 0 | 877203 |
| | II | 3302064 | 337996 | 33459141 | 7136793 | 1077857 |
| | III | | | | | |
| 6 | I | 593834 | 114816 | 4776019 | 24145318 | 6521642 |
| | II | 4307009 | 702261 | 43512864 | 54814009 | 20917454 |
| | III | 2318359 | 232042 | 16328695 | 26520882 | 4417779 |
| Temps [h] | | Arabidopside A [nmol/gMS] | Arabidopside B [nmol/gMS] | Arabidopside D [nmol/gMS] | Arabidopside E [nmol/gMS] | Arabidopside G [nmol/gMS] |
| 0 | I | 63.40 | 0.00 | 503.23 | 0.00 | 0.00 |
| | II | 115.43 | 0.00 | 1506.47 | 209.68 | 0.00 |
| | III | | | | | |
| 1 | I | 132.93 | 0.00 | 4034.26 | 1212.18 | 181.89 |
| | II | 150.64 | 60.39 | 4419.58 | 366.43 | 50.97 |
| | III | | | | | |
| 2 | I | 314.38 | 0.00 | 9754.97 | 2199.78 | 324.32 |
| | II | 209.92 | 0.00 | 5957.05 | 888.23 | 105.62 |
| | III | 604.84 | 0.00 | 12590.12 | 650.87 | 96.79 |
| 3 | I | 73.77 | 0.00 | 1844.89 | 2298.75 | 0.00 |
| | II | 94.26 | 0.00 | 1037.65 | 666.88 | 46.38 |
| | III | | | | | |
| 4 | I | | | | | |
| | II | 183.90 | 0.00 | 4759.12 | 1192.81 | 72.56 |
| | III | 129.00 | 0.00 | 3128.68 | 139.66 | |
| 5 | I | 189.47 | 0.00 | 2505.12 | 0.00 | 0.00 |
| | II | 302.22 | 0.00 | 7843.55 | 626.19 | 48.57 |
| | III | | | | | |
| 6 | I | 0.00 | 0.00 | 1244.50 | 2157.05 | 314.07 |
| | II | 436.64 | 111.40 | 11298.86 | 4333.75 | 920.72 |
| | III | 237.63 | 0.00 | 4286.83 | 2361.72 | 217.52 |
| Molécule détectée (fragment + adduit correspondant mais signal < LOQ !!!) | | | | | | |

Annexe 10. Données brutes : Quantification des arabidopsides contenus dans les feuilles

| Modalité | Répétition | Intégration arabidopside A | Intégration arabidopside B | Intégration arabidopside D | Intégration arabidopside E | Intégration arabidopside G |
|---|------------|----------------------------|----------------------------|----------------------------|----------------------------|----------------------------|
| Col0 | I | 438795 | 77462 | 2039692 | 202861 | 0 |
| | II | 280067 | 0 | 1625610 | 651600 | 0 |
| | III | 315661 | 89673 | 1633796 | 352380 | 0 |
| | IV | 1301787 | 350123 | 6763064 | 1097964 | 241484 |
| | V | 3091550 | 556748 | 16567989 | 998681 | 16625 |
| | VI | 870059 | 157800 | 4577359 | 618626 | 0 |
| | VII | 343939 | 60574 | 1950732 | 154372 | 0 |
| | VIII | 576378 | 122713 | 3563459 | 286289 | 0 |
| RPM1 | I | 326113 | 100008 | 1323153 | 0 | 0 |
| | II | | 0 | 676456 | 0 | 0 |
| | III | | 0 | 357980 | 0 | 0 |
| | IV | 77453 | 0 | 389573 | 0 | 0 |
| | V | 110963 | 0 | 492999 | 0 | 0 |
| | VI | 110819 | 0 | 493956 | 0 | 0 |
| | VII | 298595 | 132994 | 1605254 | 343122 | 0 |
| | VIII | 195875 | 0 | 1092688 | 305991 | 0 |
| RPM1- Dex 2h | I | 1054890 | 176311 | 9823421 | 5167527 | 1003830 |
| | II | 1197005 | 151872 | 9722927 | 3564295 | 72049 |
| | III | 1975707 | 366976 | 16268513 | 9432582 | 9432582 |
| | IV | 1756921 | 359922 | 14177164 | 11482927 | 2517820 |
| | V | 1322153 | 154324 | 8749660 | 2429661 | 408519 |
| | VI | 1035765 | 240746 | 7632087 | 4119909 | 1065165 |
| | VII | 1709043 | 32563 | 12266324 | 6995574 | 1669431 |
| | VIII | 85365 | 194782 | 8462358 | 4716092 | 927956 |
| RPM13 - Dex 2h | I | 129711 | 45546 | 337101 | 0 | 0 |
| | II | 28809 | 0 | 140056 | | 0 |
| | III | 126772 | 29963 | 943393 | 266909 | 0 |
| | IV | 55611 | 25480 | 374003 | 0 | 0 |
| | V | | 0 | 167482 | 0 | 0 |
| | VI | 463942 | 159614 | 2953457 | 509620 | 242777 |
| Modalité | Répétition | Arabidopside A [nmol/gMS] | Arabidopside B [nmol/gMS] | Arabidopside D [nmol/gMS] | Arabidopside E [nmol/gMS] | Arabidopside G [nmol/gMS] |
| Col0 | I | 0.00 | 0.00 | 52.99 | 0.00 | 0.00 |
| | II | 281.92 | 0.00 | 167.99 | 0.00 | 0.00 |
| | III | 0.00 | 0.00 | 92.13 | 0.00 | 0.00 |
| | IV | 126.35 | 0.00 | 272.95 | 0.00 | 0.00 |
| | V | 318.38 | 0.00 | 263.43 | 0.00 | 0.00 |
| | VI | 84.29 | 0.00 | 153.50 | 0.00 | 0.00 |
| | VII | 0.00 | 0.00 | 40.82 | 0.00 | 0.00 |
| | VIII | 0.00 | 0.00 | 71.84 | 0.00 | 0.00 |
| RPM1 | I | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 |
| | II | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 |
| | III | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 |
| | IV | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 |
| | V | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 |
| | VI | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 |
| | VII | 0.00 | 0.00 | 74.19 | 0.00 | 0.00 |
| | VIII | 0.00 | 0.00 | 69.68 | 0.00 | 0.00 |
| RPM1- Dex 2h | I | 107.69 | 0.00 | 1351.19 | 511.71 | 50.48 |
| | II | 116.75 | 0.00 | 890.39 | 340.55 | 3.49 |
| | III | 194.52 | 0.00 | 2378.69 | 878.63 | 431.23 |
| | IV | 165.15 | 0.00 | 2764.66 | 1009.64 | 115.27 |
| | V | 121.05 | 0.00 | 569.75 | 219.48 | 18.51 |
| | VI | 85.96 | 0.00 | 875.76 | 333.79 | 43.53 |
| | VII | 170.04 | 0.00 | 1782.73 | 667.80 | 81.41 |
| | VIII | 0.00 | 0.00 | 1215.81 | 461.71 | 46.04 |
| RPM13 - Dex 2h | I | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 |
| | II | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 |
| | III | 0.00 | 0.00 | 58.03 | 0.00 | 0.00 |
| | IV | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 |
| | V | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 |
| | VI | 0.00 | 0.00 | 105.24 | 0.00 | 0.00 |
| | VII | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 |
| | VIII | 0.00 | 0.00 | 134.72 | 0.00 | 0.00 |
| Molécule détectée (fragment + adduit correspondant mais signal < LOQ !!!) | | | | | | |
| Valeurs aberrantes | | | | | | |

Annexe 11. Données brutes : Quantification des arabidopsides contenus dans les chloroplastes

| Modalité | Répétition | Intégration arabidopside A | Intégration arabidopside B | Intégration arabidopside D | Intégration arabidopside E | Intégration arabidopside G |
|--|------------|----------------------------|----------------------------|----------------------------|----------------------------|----------------------------|
| Col0 | I | 3959275 | 1330061 | 18204153 | 0 | 0 |
| | II | 572046 | 323490 | 11382194 | 0 | 0 |
| | III | 1886723 | 611594 | 14127200 | 0 | 0 |
| | IV | 395504 | 156411 | 9222855 | 0 | 0 |
| | V | 8758833 | 1823834 | 229139 | 0 | 0 |
| | VI | 1354708 | 373546 | 8666422 | 0 | 0 |
| | VII | 6312341 | 1628566 | 2848966 | 0 | 0 |
| | VIII | 901907 | 400601 | 9290234 | 0 | 0 |
| RPM1 | I | 274412 | 123601 | 2556382 | 0 | 0 |
| | II | 449169 | 81136 | 2927883 | 0 | 0 |
| | III | 110122 | 98858 | 1575839 | 0 | 0 |
| | IV | 1515505 | 411794 | 6408177 | 0 | 0 |
| | V | 415063 | 179793 | 2443787 | 0 | 0 |
| | VI | 103993 | 58512 | 1028024 | 0 | 0 |
| | VII | 174407 | 88658 | 1184043 | 0 | 0 |
| | VIII | | | | | |
| RPM1- Dex 2h | I | 1434848 | 596826 | 11847208 | 0 | 0 |
| | II | 1516596 | 611700 | 14831293 | 0 | 0 |
| | III | 3167262 | 1088874 | 26677584 | 0 | 0 |
| | IV | 2914495 | 1592739 | 22075558 | 0 | 0 |
| | V | 911250 | 331637 | 9336852 | 0 | 0 |
| | VI | 1312141 | 474252 | 12959194 | 0 | 0 |
| | VII | | | | | |
| | VIII | 1510684 | 494906 | 18492871 | 0 | 0 |
| RPM13 - Dex 2h | I | 695027 | 328401 | 8556657 | 0 | 0 |
| | II | 868067 | 234449 | 7496989 | 0 | 0 |
| | III | 697555 | 218588 | 7442260 | 0 | 0 |
| | IV | 940785 | 291974 | 8982142 | 0 | 0 |
| | V | 1733902 | 430567 | 17098184 | 0 | 0 |
| | VI | 1072520 | 126695 | 8501337 | 0 | 0 |
| | VII | 1188411 | 261350 | 13973749 | 0 | 0 |
| | VIII | 2913699 | 820984 | 23195947 | 0 | 0 |
| Modalité | Répétition | Arabidopside A [nmol/gMS] | Arabidopside B [nmol/gMS] | Arabidopside D [nmol/gMS] | Arabidopside E [nmol/gMS] | Arabidopside G [nmol/gMS] |
| Col0 | I | 63.83 | 33.55 | 751.68 | 0.00 | 0.00 |
| | II | 5.64 | 4.99 | 287.61 | 0.00 | 0.00 |
| | III | 59.38 | 30.12 | 1138.90 | 0.00 | 0.00 |
| | IV | 16.34 | 10.11 | 975.87 | 0.00 | 0.00 |
| | V | 289.47 | 94.31 | 19.40 | 0.00 | 0.00 |
| | VI | 44.77 | 19.32 | 733.60 | 0.00 | 0.00 |
| | VII | 245.43 | 99.08 | 283.72 | 0.00 | 0.00 |
| | VIII | 37.26 | 25.89 | 983.00 | 0.00 | 0.00 |
| RPM1 | I | 6.72 | 4.73 | 160.29 | 0.00 | 0.00 |
| | II | 8.73 | 2.47 | 145.79 | 0.00 | 0.00 |
| | III | 3.31 | 4.65 | 121.27 | 0.00 | 0.00 |
| | IV | 35.78 | 15.21 | 387.46 | 0.00 | 0.00 |
| | V | 9.80 | 6.64 | 147.76 | 0.00 | 0.00 |
| | VI | 4.91 | 4.32 | 124.32 | 0.00 | 0.00 |
| | VII | 7.20 | 5.73 | 125.28 | 0.00 | 0.00 |
| | VIII | | | | | |
| RPM1- Dex 2h | I | 19.76 | 12.86 | 417.85 | 0.00 | 0.00 |
| | II | 28.64 | 18.08 | 717.40 | 0.00 | 0.00 |
| | III | 77.54 | 41.71 | 1672.75 | 0.00 | 0.00 |
| | IV | 80.27 | 68.64 | 1557.22 | 0.00 | 0.00 |
| | V | 13.38 | 7.62 | 351.27 | 0.00 | 0.00 |
| | VI | 41.30 | 23.36 | 1044.74 | 0.00 | 0.00 |
| | VII | #DIV/0! | #DIV/0! | #DIV/0! | 0.00 | 0.00 |
| | VIII | 55.47 | 28.44 | 1739.32 | 0.00 | 0.00 |
| RPM13 - Dex 2h | I | 8.83 | 6.53 | 278.58 | 0.00 | 0.00 |
| | II | 40.98 | 17.32 | 906.58 | 0.00 | 0.00 |
| | III | 38.42 | 18.84 | 1049.96 | 0.00 | 0.00 |
| | IV | 28.27 | 13.73 | 691.20 | 0.00 | 0.00 |
| | V | 45.84 | 17.81 | 1157.87 | 0.00 | 0.00 |
| | VI | 24.45 | 4.52 | 496.29 | 0.00 | 0.00 |
| | VII | 24.55 | 8.45 | 739.28 | 0.00 | 0.00 |
| | VIII | 68.78 | 30.32 | 1402.50 | 0.00 | 0.00 |
| Molécule détectée (fragment + adduit correspondant mais signal < LOQ !!! | | | | | | |

Annexe 12. Données brutes : Analyse cytométrie sur chloroplastes

| Mesure-Modalité | FSC-Co10 | FSC-RPM1 | FSC-RPM1 avec Dex | FSC-RPM13 avec Dex | SSC-Co10 | SSC-RPM1 | SSC-RPM1 avec Dex | SSC-RPM13 avec Dex | FL3-Co10 | FL3-RPM1 | FL3-RPM1 avec Dex | FL3-RPM13 avec Dex | FL4-Co10 | FL4-RPM1 | FL4-RPM1 avec Dex | FL4-RPM13 avec Dex |
|-----------------|----------|----------|-------------------|--------------------|----------|----------|-------------------|--------------------|----------|----------|-------------------|--------------------|----------|----------|-------------------|--------------------|
| I | 680905 | 603429 | 647017 | 644316 | 68816 | 67720 | 74262 | 76401 | 1640588 | 1240068 | 1450778 | 1282660 | 324472 | 234425 | 282748 | 258337 |
| II | 617435 | 683428 | 653573 | 647061 | 68934 | 69248 | 73479 | 73108 | 1442758 | 1345181 | 1471416 | 1342050 | 283314 | 265328 | 284693 | 266630 |
| III | 633987 | 664471 | 641697 | 677395 | 69772 | 67865 | 68302 | 73980 | 1433987 | 1385575 | 1415273 | 1404341 | 287106 | 266455 | 269156 | 286876 |
| IV | 585198 | 651428 | 624348 | 632154 | 59897 | 65917 | 69225 | 70101 | 1249413 | 1376446 | 1347204 | 1268501 | 248069 | | 260801 | 258729 |
| V | 584452 | 659160 | 660027 | 589574 | 72179 | 63291 | 69983 | 63611 | 1311543 | 1445583 | 1487656 | 1269286 | 266880 | 288950 | 305617 | 258393 |
| VI | 589342 | 616286 | 653160 | 620903 | 74265 | 58966 | 65126 | 69841 | 1261061 | 1343997 | 1509140 | 1459630 | 259268 | 266574 | 309148 | 298326 |
| VII | 591831 | 668290 | 622244 | 618032 | 71140 | 67032 | 70766 | 67958 | 1283089 | 1469903 | 1376744 | 1512492 | 267328 | 308830 | 290596 | 317569 |
| VIII | 551760 | 594879 | | | 65067 | 64829 | | | 1079838 | 1349742 | | | 218948 | 268078 | | |
| Moyenne | 604364 | 642671 | 643152 | 632776 | 68759 | 65609 | 70163 | 70714 | 1337785 | 1369562 | 1436887 | 1362709 | 269423 | 270949 | 286108 | 277837 |
| Ecart-type | 39317 | 33083 | 14727 | 27548 | 4487 | 3274 | 3107 | 4241 | 167279 | 70266 | 59597 | 98319 | 30831 | 22452 | 17667 | 23555 |

Annexe 13. Données brutes : Potentiel zêta des chloroplastes et thylakoïdes

| | Col | | RPM1 | | RPM1 avec Dex | | RPM13 avec Dex | |
|-------------|-----------|---------------|-----------|---------------|---------------|---------------|----------------|---------------|
| Répétitions | Sonde DPH | Sonde TMA-DPH | Sonde DPH | Sonde TMA-DPH | Sonde DPH | Sonde TMA-DPH | Sonde DPH | Sonde TMA-DPH |
| I | 0.470 | 0.413 | 0.500 | 0.308 | 0.426 | 0.251 | 0.518 | 0.297 |
| II | 0.531 | 0.386 | 0.582 | 0.435 | 0.430 | 0.514 | 0.556 | 0.517 |
| III | 0.547 | 0.407 | 0.556 | 0.454 | 0.443 | 0.357 | 0.446 | 0.501 |
| IV | 0.596 | 0.598 | 0.616 | 0.626 | 0.465 | 0.465 | 0.633 | 0.589 |
| Moyenne | 0.536 | 0.451 | 0.564 | 0.456 | 0.441 | 0.397 | 0.538 | 0.476 |
| Ecart-type | 0.052 | 0.099 | 0.049 | 0.131 | 0.017 | 0.117 | 0.078 | 0.125 |